

Dilnei Souza Medeiros

**TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DE BANANEIRA CV. GRANDE NAINÉ
E CV. PRATA CATARINA INFLUENCIADA PELA FASE DE
ESTABELECIMENTO DE CULTURA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Rosete
Pescador

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medeiros, Dilnei

TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE
BANANEIRA CV. GRANDE NAINA E CV. PRATA CATARINA
INFLUENCIADA PELA FASE DE ESTABELECIMENTO DE CULTURA /
Dilnei Medeiros ; orientadora, Rosete Pescador -
Florianópolis, SC, 2015.

119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 3. Banana. 4.
Micropropagação. 5. Cultura de tecidos. I. Pescador,
Rosete. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
III. Título.

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “....”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

As minhas três divas:

Minha bondosa *Mãe Anência de S. Medeiros*, que me faz aprender a cada dia com sua imensa sabedoria e humildade; A minha esforçada e capaz *Filha Gabriela L. Medeiros*, parceira em tudo... “estaremos juntos, sempre”. E não menos importante, minha amada *Noiva Maiara Goulart Medeiros*, fonte de inspiração e determinação, tens o “dom” de me fazer feliz! *DEDICO*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar em mais este grandioso desafio, concedendo-me saúde e subsídios materiais e espirituais em toda jornada.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rosete Pescador pela surpreendente dedicação, amizade, otimismo, paciência e principalmente pela confiança depositada. Não tenho palavras para expressar minha gratidão. Não esquecerei o bordão “seguimos em frente...”

Ao colega de trabalho e Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari por seu conhecimento e humanidade. Tenho muito a agradecer e plena convicção que não conseguiria ter dado este passo sem sua colaboração.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela formação acadêmica, estrutura física e humana para realização deste trabalho.

A EPAGRI/ EEI pela estrutura física e material vegetal utilizado no experimento.

Agradeço a todos os professores do RGV por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação, em especial aos professores Marisa Santos, Maurício Sedrez dos Reis, Miguel Pedro Guerra, Rubens O. Nodari e Rosete Pescador, verdadeiros Mestres.

A Banca Examinadora, Dr. Gilmar Roberto Zaffari, Dr. Miguel Pedro Guerra e Dr.^a Marisa Santos por aceitarem compor a banca.

Ao Prof. Dr. Paulo César Firmino e ao Prof. Dr. Marcelo Borghezan e ao Prof. Dr. Henry Stuker, pelas valorosas colaborações com o projeto de dissertação.

A toda equipe do LAVEG, em especial a Prof.^a Marisa Santos, sempre contagiando com seu otimismo e dedicação, sou muito grato por sua colaboração e confiança. Também agradeço a Márcia, a Maiby, a Ana, a Raquel, equipe muito prestativa. Aos colegas do LFDGV, as Dani's (Werner e Conti), Vivian Almeida, Jenny Paola e em especial ao Daniel Rosa, que me surpreendeu com a colaboração nas análises bioquímicas, disponível até tarde da noite. Muito parceiro!

Aos meus irmãos de sangue, Cláudio S. Medeiros, Edson S. Medeiros, Ana S. Medeiros, Sandra S. Medeiros, e meus irmãos de coração, Adriana Pereira, Fabiano Beil, Maria Helena M. Goulart, Maurício C. Silva, Suzete M. Rovaris e Taynara G. Medeiros, que compreenderam minha ausência neste período e que com um simples “vá em frente”, me motivaram a seguir. Meu muito obrigado!

*“Quando uma criatura humana desperta para um
grande sonho e sobre ele lança toda a força de
sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”*

(Goethe)

RESUMO

A bananeira é a segunda fruteira mais cultivada do mundo, sendo o Brasil o quinto *no ranking*, com 6,8% da produção mundial de banana. No ano de 2014, a estimativa da área de produção brasileira foi de 490,1 mil hectares, produção de 7,18 milhões de toneladas de frutas (EPAGRI/CEPA, 2014). Nas últimas décadas, a produção se expandiu na maioria dos países produtores; passou de 35 milhões para 102 milhões de toneladas entre as safras 1978 e de 2012, parte deste aumento de produção se deve ao avanço tecnológico, principalmente devido disponibilidade de material genético diversificado e de mudas com valor agregado, principalmente qualidade fitossanitária obtida através de técnicas biotecnológicas. Apesar das biofábricas terem protocolos de micropropagação bem sucedidos, os mesmos não são suficientes para atenderem a demanda com qualidade e quantidade de mudas. Nos últimos anos os sistemas de propagação, em larga escala, não atingiu o número de mudas desejadas, mesmo com a utilização de biorreatores de imersão temporária, o qual tem sido associado ao aumento dos riscos de surgimento de variantes somaclonais. O presente trabalho teve por objetivo mostrar o comportamento das culturas *in vitro* de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, submetidas a alterações no protocolo de micropropagação, comumente utilizado em biofábricas, visando obter maior taxa de multiplicação. Utilizando-se de material vegetal proveniente da coleção da EPAGRI/EEI, o trabalho foi dividido em duas etapas: fase de estabelecimento de cultura e fase de multiplicação. Na fase de estabelecimento, utilizou-se como meio base a formulação MS, acrescida de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA, tendo como variáveis nos tratamentos propostos: aumento do tempo de cultivo *in vitro*; alterações de concentração de sais e adição de diferentes fitormônios. Para a fase de multiplicação utilizou-se as culturas provenientes da fase de estabelecimento, em cinco subcultivos de 30 dias, utilizando a formulação do meio MS e tendo como variáveis: alteração no estado físico (sólido/líquido), adição de BAP e adição de BAP/ANA. O meio MS, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP promoveu a maior taxa de multiplicação, em ambas as cultivares estudadas. As melhores taxas de multiplicação quando consideradas fases de estabelecimento e multiplicação, para cultivar Grande Naine, foram obtidas em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA por 90 dias em estabelecimento de cultura, utilizando na sequência meio MS com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP para multiplicação em 5 subcultivos de 30

dias consecutivos, alcançando taxas de multiplicação de 356 brotos por explante inicial, superior em 5 vezes ao obtido no tratamento similar ao praticado em biofábricas. Quanto a cultivar Prata Catarina o desempenho obtido não foi superior ao alcançado em biofábricas e os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Foi utilizado meio MS com 50% dos sais da formulação para prover crescimento e enraizamento. Na fase de aclimatização, o método utilizado foi eficiente gerando número total de mudas para as cultivares Grande Naine e Prata Catarina de 8.995 e 3.911, respectivamente. O estudo indicou que alterações na fase de estabelecimento de cultura resultam em aumento da taxa de multiplicação para o cv. Grande Naine, enquanto que para o cv. Prata Catarina não apresenta efeito significativo.

Palavras-chave: multiplicação *in vitro*. Monocotiledônea. cultura de tecidos. banana.

ABSTRACT

The Banana is the second most cultivated fruit tree in the world, and Brazil is the fifth in the ranking, with 6.8% of the world production. In the year 2014, the estimate of Brazilian production area was 490,100 hectares, producing 7.18 million tons of fruit (EPAGRI/CEPA, 2014). In the last decades, production has expanded in most producing countries, from 35 million tons in 1978 to 102 million tons in 2012, part of this increase in production is due to technological advances related to the availability of more genetically diverse germplasm and of seedlings with higher sanitary quality obtained through biotechnological techniques. Despite successful micropropagation protocols adopted by biofactories, they are not sufficient to meet the demand with quality and quantity of seedlings. In recent years propagation systems on a large scale has not reached the desired number of plants, even with the use of temporary immersion bioreactor, which has been associated with increased risks of onset of somaclonal variants. This study aimed to show the behavior of *in vitro* cultures of *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine and of *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina when changes in the micropropagation protocol were made compared to the traditional protocols, for an increase in the micropropagation rate. The work was divided in two phases, namely culture establishment and culture multiplication. The explants used came from a field collection established at Epagri/Itajaí Research Station. In the phase of establishment of culture, MS base medium plus 1 mg.L⁻¹ BAP and 1 mg.L⁻¹ NAA was used, and there was an increase in the *in vitro* culture time, as well as changes in the salt concentration and in the phytohormones used. For the multiplication phase, materials generated from five subcultures of 30 days each were used, and changes in the physical state (solid/liquid) and in the concentration of cytokinin (BAP) and cytokinin/auxin (NAA). The treatment that consisted of MS medium plus 2.5 mg.L⁻¹ BAP promoted

the highest multiplication rate in both cultivars. For the cultivar Grande Naine, the highest multiplication rates for both the establishment and the multiplication phases were obtained when MS medium plus 1 mg.L⁻¹ de BAP and 1 mg.L⁻¹ de NAA for 90 establishing days in culture was used, followed by multiplication in MS medium with 2.5 mg.L⁻¹ BAP in five subcultures of 30 days each; the multiplication rates obtained were 356 shoots per initial explant, five times higher than that obtained in a similar treatment adopted by biofactories. However, for the cultivar Prata Catarina, the performance of the treatments was not statistically different from the performance of the traditional protocols adopted by biofactories. Half-strength MS medium was used to promote growth and root development. The method adopted in the acclimatization stage was efficient, generating 8,995 and 3,911 plants for the cultivars Grande Naine and Prata Catarina, respectively. The study indicated that change in culture establishment phase result in increased multiplication rate for the cv. Grand Naine, while for cv. Prata Catarina has no significant effect

Keywords: *in vitro* multiplication. monocot. tissue culture. banana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As frutas mais produzidas no mundo (2012 – toneladas).....	33
Figura 2 –Planta matriz de <i>Musa sp.</i> cultivar Grande Naine a campo. A – coleta de perfilhos de bananeira do tipo “chifrinho”; B – dissecação a campo do material vegetal coletado; C – material vegetal dissecado pronto para envio ao telado; D – dissecação.	55
Figura 3 -Etapas da micropropagação de <i>Musa sp.</i> cultivar Prata Catarina na fase de estabelecimento de cultura. A – assepsia de material vegetal, com explantes imersos em solução de NaOCl a 1%, por 30 minutos ; B – padrão de explantes dissecados e prontos para para inoculação no meio de cultura; C - explante dissecado à medidas de 0,8 cm de base por 1,5 cm de altura; D – explante inoculado <i>in vitro</i> em meio MS acrescido de 1 mg.L ⁻¹ de ANA e 1 mg.L ⁻¹ de BAP.	56
Figura 4 - Volume médio de explantes (material vegetal), unidades experimentais <i>in vitro</i> , obtidos aos 60 dias de cultivo, na fase de estabelecimento de cultura. Em A - cultivar Grande Naine; em B - cultivar Prata Catarina. Barras verticais indicam intervalo de confiança (IC).	58
Figura 5 - Representação de níveis percentuais de oxidação em material vegetal <i>in vitro</i> de <i>Musa sp.</i> 0% – não oxidado; 50% - metade do material oxidado; 100% - material totalmente oxidado.	59
Figura 6 - Procedimentos para obtenção de lâminas com secções transversais em amostras explante de <i>Musa cv.</i> Grande Naine, coletadas na fase de estabelecimento de cultura. A – redução do tamanho do explante para região de interesse, marcado com seta preta (região de surgimento de folhas e maior probabilidade de organização celular, gemas); B – Secções transversais de 25 µm sendo obtidas em micrótomo de rotação Leica - RM 2125 RT; C - formação de “fitas”, distendidas em lâminas (6 secções por lâmina); D – Secagem por 1-2h a temperatura de 42 ±2 °C, em chapa de aquecimento.	60
Figura 7 - Secção transversal de 25 µm do pseudocaule do cultivar de bananeira Prata Catarina, tratamento TEC3, contendo 5 folhas após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Sequencia de contagem de folhas: F1 – folha 1, F2 – folha 2, F3 – folha 3, F4 – folha 4, F5 – folha 5. Imagem obtida em Lupa Leica com aumento de 20 x.....	61

Figura 8 - Etapas da micropropagação de *Musa sp.*, cultivar Grande Naine na fase de multiplicação. A – raspagem com bisturi nas laterais do explante para redução da oxidação; B - quebra de dominância apical com corte longitudinal em “X”, sem a divisão do explante; C – exemplo de brotações resultantes de uma unidade experimental; D - brotações excisadas e prontas para inoculação no próximo subcultivo; E - tratamentos (material *in vitro*) armazenados em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados.....63

Figura 9 - Fluxograma geral das etapas do experimento, contendo fases e tempos de cultivo, tratamentos, subcultivos e meios de cultura ou substrato utilizado.....67

Figura 10 - Material vegetal *in vitro* de *Musa sp.* cultivar Grande Naine após finalização da fase de estabelecimento de cultura, exemplificando o aspecto das amostras com percentual de oxidação obtido no explante: A - 50% e B - 100%.68

Figura 11 - Percentuais médios de oxidação em unidades experimentais *in vitro*, obtidos na finalização da fase de estabelecimento de cultura. Em A – cultivar Grande Naine; em B - cultivar Prata Catarina, Barras verticais indicam intervalos de confiança (IC).69

Figura 12 - Teores de Carboidratos Solúveis Totais (CST) em explantes de bananeira. A – cultivar Grande Naine; B - cultivar Prata Catarina; T0: antes de inoculação *in vitro* e TEC1 a TEC5: *in vitro*, na finalização do período de estabelecimento de cultura. (curva padrão: $y = 0,0152x + 0,0239$; $R = 0,9960$). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%...76

Figura 13 - Teores de Amido em explante de bananeira. A – cultivar Grande Naine; B - cultivar Prata Catarina; T0: antes de inoculação *in vitro* e TEC1 a TEC5: *in vitro*, na finalização do período de estabelecimento de cultura. (curva padrão: $y = 0,0152x + 0,0239$; $R = 0,9960$). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.78

Figura 14 - Número médio de folhas em explante de *Musa sp.*, cultivares Grande Naine e Prata Catarina. Antes da inoculação no meio de cultura (T0) e ao final da fase de estabelecimento de cultura (TEC1 a TEC5) com imagens extraídas de seções transversais de 25 µm, expostas sequencialmente (do topo para base) em prancha de imagens.79

Figura 15. Seções transversais de 25 µm do cultivar Prata Catarina no tratamento TEC3 com 90 dias de cultivo, obtidas sequencialmente do ápice para base, de região de surgimento de primórdios foliares, próximo a gema apical.. Imagens extraídas de prancha de exposição sequencial composta de 50 fotos, sequência: A – foto 1; B – foto 11; C – foto 20; D – foto 29; E – foto 37; F – foto 49. Obtidas em microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes.....80

Figura 16 – Tendência comportamental do número médio de brotos por explante ao longo de 5 subcultivos (SC), em mudas dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina submetidos a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação. MM1 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP e 0,7% de Agar; MM2 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP, 0,25mg.L⁻¹ de ANA e 0,7% de Agar; MM3 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP (líquido); TEC1: 60 dias (testemunha); TEC2: 90 dias; TEC3: 60 + 30 dias MS/2; TEC4: 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L⁻¹; TEC5: 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L⁻¹.92

Figura 17 – Unidades experimentais, contendo mudas de *Musa sp.* cultivar Grande Naine do tratamento de estabelecimento de cultura TEC2 com tratamento de multiplicação TM3, na fase de enraizamento *in vitro*, 45 dias....93

Figura 18 - Mudas de *Musa sp.* cv. Grande Naine aos 60 dias da fase de aclimatização em tubetes contendo substrato composto a base de casca de arroz carbonizada, substrato orgânico e calcário.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de mudas e período necessário para obtenção de plantas a partir de diferentes métodos de propagação da bananeira.40

Tabela 2 - Meios de cultura e seus respectivos códigos, uso em fases do cultivo *in vitro* e composição, tendo como base MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g.L⁻¹ de sacarose e com pH 5,8.....54

Tabela 3 -. Tratamentos de cultivar e da fase de estabelecimento de cultura, com seus respectivos tempos de exposição *in vitro* e meios de culturas utilizados.57

Tabela 4 - Altura média e volume médio do explante *Musa sp.*, cultivar Grande Naine, *in vitro*, obtidos aos 60 dias de cultivo para o tratamento TEC1 e aos 90 dias de cultivo para os tratamentos TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5.71

Tabela 5 - Altura média e volume médio do explante *Musa sp.*, cultivar Prata Catarina, *in vitro*, obtidos aos 60 dias de cultivo para o tratamento TEC1 e aos 90 dias de cultivo para os tratamentos TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5.72

Tabela 6 - Número médio de folhas no final da fase de estabelecimento de cultura (60 dias para TEC1 e 90 dias para os demais tratamentos) e número médio de brotos obtidos ao final do primeiro subcultivo de 30 dias na fase de multiplicação, ambos dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina.....80

Tabela 7 - Número médio de brotos por explante inicial estabelecido da cv. Grande Naine, após quinto subcultivo de multiplicação. Meios de estabelecimento de cultura: MEC1 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA; MEC2 – MS, com 50% dos sais da formulação; MEC3 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol; MEC4 – MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol. Tratamentos de multiplicação: TM1 – meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP; TM2 – meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA; TM3 - meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e meio MS líquido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP , intercalados do primeiro ao quinto subcultivo.....84

Tabela 8 - Número médio de brotos por explante inicial estabelecido da cv. Prata Catarina, após quinto subcultivo de multiplicação. Meios de estabelecimento de cultura: MEC1 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA; MEC2 – MS, com 50% dos sais da formulação; MEC3 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol; MEC4 – MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol. Tratamentos de multiplicação: TM1 – meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP; TM2 – meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA; TM3 - meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e meio MS líquido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP , intercalados do primeiro ao quinto subcultivo.....87

Tabela 9 - Número médio de brotos/ explante ao longo de cinco subcultivos, em mudas de bananeira dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina, submetidas a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação.	89
Tabela 10 - Número médio de brotos/ explante ao longo de cinco subcultivos, em mudas de bananeira dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina, submetidas a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação.	90
Tabela 11 - Número total de brotos nas fases de enraizamento e aclimatização e percentuais de rendimento em tratamentos para <i>Musa sp</i> cv. Grande Naine	93
Tabela 12 – Rendimento percentual médio de número de brotos por tratamento de multiplicação (TM) da cv. Grande Naine, no final da fase de enraizamento (45 dias).	94
Tabela 13 - Número total de brotos nas fases de enraizamento e aclimatização e percentuais de rendimento em tratamentos para <i>Musa sp</i> cv. Prata Catarina.....	95
Tabela 14 – Rendimento percentual médio de número de brotos por tratamento de multiplicação (TM) da cv. Prata Catarina, no final da fase de enraizamento (45 dias).	96
Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume médio de explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 43,30.	114
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume médio de explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 36,10.	114
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA), referente ao nível de oxidação em explantes <i>in vitro</i> da cultivar Grande Naine; CV% = 13,35.	114
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA), referente ao nível de oxidação em explantes <i>in vitro</i> da cultivar Prata Catarina; CV% = 5,81.	115
Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA), referente a altura de explantes <i>in vitro</i> da cultivar Grande Naine; CV% = 15,6.	115
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume de explantes <i>in vitro</i> da cultivar Grande Naine; CV% = 40,52.	115
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA), referente a altura de explantes <i>in vitro</i> da cultivar Prata Catarina; CV% = 11,84.	116
Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume de explantes <i>in vitro</i> da cultivar Prata Catarina; CV% = 32,12.	116
Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de amido em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 20,59.	116

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 15,17..... 117

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de amido em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 12,28..... 117

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 11,17. 117

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA), referente ao número de brotos/rizoma obtidos no quinto subcultivo da fase de multiplicação da cultivar Grande Naine. Demonstrando interação entre os tratamentos da fase de estabelecimento de cultura TEC e tratamentos de multiplicação TM. 118

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA), referente ao número de brotos/rizoma obtidos no quinto subcultivo da fase de multiplicação da cultivar Prata Catarina. Demonstrando interação entre os tratamentos da fase de estabelecimento de cultura TEC e tratamentos de multiplicação TM. 118

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA), referente ao rendimento obtido na fase de enraizamento em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 7,84... 119

Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 22,84. 119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA – *Musa acuminata*

AAB - *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*

ANA – Ácido naftaleno acético

BAP – Benzilaminopurina

BIT – Biorreator de imersão temporária

BSV - Banana streak vírus

CDC's – Ciclos de divisão celular

Cepa – Centro de socioeconômica e planejamento agrícola

Cm – centímetro

CV – Coeficiente de variação

DMS – Diferença mínima significativa

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EEI – Estação experimental de Itajaí

EPAGRI – Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina

FAO – Food and agriculture organization

G – Grama – g - grama

Ga3 – Ácido giberélico

Ha – Hectare

IC – Intervalo de com fiança

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

K – Potássio

Kg - Quilograma

L - Litro

LAVEG - Laboratório de anatomia vegetal

LFDGV - Laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal

MEC – Meio de estabelecimento de cultura

MF – Matéria fresca

Mg – Miligrama – mg - miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MM – Meio de multiplicação

MS – Murashige e Skoog

Na – Sódio

nm - Nanômetro

NPK – Nitrogênio, fósforo e potássio

rpm – Rotação por minuto

TCAT - Tratamento da cultivar Prata Catarina

TEC – Tratamento de estabelecimento de cultura

TGN - Tratamento da cultivar Grande Naine

TM – Tratamento de multiplicação

UFSC – Universidade federal de Santa Catarina

US – Dólar

μL – Microlitro

μm – Micrometro

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	26
2,0 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
2.2.1 Na fase de estabelecimento de cultura.....	29
2.2.2 Na fase de multiplicação.....	29
2.2.3 Nas fases de enraizamento e de aclimatização.....	30
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
3.1 A cultura da Bananeira.....	30
3.1.1 Classificação botânica e origem.....	30
3.1.2 Morfologia.....	31
3.1.3 Importância socioeconômica.....	33
3.1.4 Recursos genéticos disponíveis.....	36
3.1.5 Principais Cultivares.....	36
3.1.5.1 Cultivar Grande Naine.....	37
3.1.5.2 Cultivar Prata Catarina.....	37
3.2 Métodos de Propagação da bananeira.....	38
3.2.1 Propagação por meio de sementes.....	38
3.2.2 Propagação vegetativa.....	38
3.2.2.1 Métodos de Propagação convencional.....	40
3.2.2.2 Método de Micropropagação.....	41
3.3 Fatores que afetam a micropropagação de plantas.....	45
3.3.1 Oxidação.....	45
3.3.2 Dominância apical.....	46
3.3.3 Variação somaclonal.....	47
3.4 Biofábricas de produção de mudas de bananeira.....	49
3.5 Hormônios e reguladores de crescimento vegetais.....	51
3.6 Carboidratos.....	51

3.7 Amido.....	52
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Material vegetal.....	53
4.2 Meios de cultura.....	53
4.3 Fase de estabelecimento de cultura (introdução <i>in vitro</i>).....	54
4.3.1 Plano amostral para análises morfoanatômicas e bioquímicas.....	59
4.3.2 Análise estrutural em microscopia.....	59
4.3.2.1 Quantidade de folhas.....	59
4.3.3 Extração e determinação de carboidratos totais.....	61
4.3.4 Extração e determinação do conteúdo de amido.....	62
4.4 Fase de multiplicação.....	63
4.5 Fase de enraizamento.....	64
4.6 Aclimatização.....	64
4.7 Delineamento experimental e Análise estatística.....	65
4.8 Condução do experimento.....	66
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1 Fase de estabelecimento de cultura <i>in vitro</i>	68
5.1.1 Oxidação.....	68
5.1.2 Altura e volume dos explantes.....	71
5.1.3 Análise bioquímica – Teor de Carboidratos Solúveis Totais e Teor de amido.....	75
5.1.3.1 Carboidratos Solúveis Totais.....	75
5.1.3.2 Amido.....	77
5.1.4 Análise estrutural - Número de folhas.....	78
5.2 Fase de Multiplicação.....	81
5.2.1 Taxa de multiplicação.....	81
5.2.1.1 Cultivar Grande Naine (AAA).....	81
5.2.1.2 Cultivar Prata Catarina (AAB).....	85
5.2.1.3 Comparação entre os cultivares Grande Naine e Prata Catarina.....	88

5.2.1.4 Comportamento de número de brotos nos cinco subcultivos, para os cultivares Grande Naine (AAA) e Prata Catarina (AAB).....	91
5.3 Fase de Enraizamento e Aclimatização.....	93
6.0 CONCLUSÕES.....	97
7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
9.0 ANEXOS.....	114

1.0 INTRODUÇÃO

Bananas e Plátanos representam o segundo maior cultivo de frutalimento do mundo, produzidas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em países em desenvolvimento. Na última década o crescimento do cultivo de banana tem assistido a grandes avanços, passando de 66,84 milhões de toneladas em 2001 para 95,60 milhões de toneladas em 2009 (SINGH et al., 2011). Segundo a FAO (2014), a produção de banana, já apresentava 101,993 milhões de toneladas produzidas em 2012, mostrando ascensão produtiva a nível mundial.

No Brasil, para o ano de 2014, a estimativa de área plantada produtiva foi de 490,1 mil hectares com 7,18 milhões de toneladas de frutas (EPAGRI/CEPA, 2014). Sua produção é praticamente consumida *in natura* e o seu cultivo tem papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural. A banana constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo alto valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Sabe-se que uma banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C. Contém, ainda, vitaminas A e B, muito potássio (K), pouco sódio (Na) e nenhum colesterol. Além do elevado valor nutritivo, a banana tem alto significado socioeconômico, pois mobiliza um grande contingente de mão-de-obra, permite retorno rápido ao produtor e é geradora de divisas para o País.

Santa Catarina destaca-se no cenário nacional como o quarto maior produtor de banana, com aproximadamente seis mil produtores. Dados da safra catarinense para 2014 mostram colheita total de 29,134 mil hectares, o que representa 665,468 mil toneladas. No estado, a exemplo do município de Luiz Alves, situado no vale do Itajaí, a 140 km de Florianópolis, existe a predominância da pequena propriedade, caracterizada por áreas menores que 30 hectares. A maior parte da população está envolvida em atividades agrícolas e a bananicultura contribui significativamente para a economia do município.

Com o aumento do consumo mundial de banana, a abertura de novos mercados e a maior exigência dos consumidores brasileiros, evidencia-se a necessidade de novas estratégias de cultivo, de novas áreas de plantio e renovação de áreas pouco produtivas, sendo fundamental a utilização de mudas de bananeira com alta qualidade genética e fitossanitária (TRINDADE et al., 2003).

A adoção de material de plantio de alta qualidade, livre de doenças, desenvolvido por meio de cultura de tecidos tem sido uma adição importante nos últimos anos (SINGH et al., 2011).

A cultura de tecidos se baseia na teoria da totipotencialidade celular, na qual as células tem a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora. Teoricamente, considera-se que as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes são compostos por tecidos e diferentes células em variados estados: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. O desenvolvimento refere-se ao crescimento integrado de várias partes de um ser pluricelular envolvendo basicamente, os processos de divisão, expansão e diferenciação celular e a consequente formação de tecidos, órgãos e sistemas. (PERES, 2002). Nesse sentido, espera-se que a exposição de explantes em ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, ou seja, tenham competência. Em decorrência da cultura de tecidos o desenvolvimento de técnicas de micropropagação, permitiu a rápida propagação clonal, a regeneração, e a multiplicação de clones superiores.

A micropropagação de bananeira envolve o cultivo, em condições assépticas, de explantes de ápices caulinares. A partir de uma única gema, podem ser obtidas centenas de mudas com fidelidade genética, em poucas gerações. Este método permite a produção *in vitro* em larga escala, seguida da aclimatização em casa de vegetação, possibilitando a obtenção de material livre de pragas e doenças (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

Nos diferentes métodos de propagação vegetativa, em relação ao número de mudas obtidas e o tempo empregado na produção, verifica-se que a micropropagação é muito superior aos demais métodos. Assim, se pelo método convencional de produção de mudas obtém-se de 10 a 30 mudas/planta em 12 meses, na micropropagação pode-se obter 300 mudas/ápice isolado em 6 a 8 meses (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

As Biofábricas, empresas que produzem e comercializam mudas micropropagadas, vêm se implantando no Brasil, com a instalação de diversos laboratórios comerciais em diferentes regiões do País. Este fato tem permitido um acesso mais rápido dos agricultores à mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais, das novas cultivares e dos híbridos desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético (CARVALHO et al., 2012).

Levando em consideração os custos de produção e a estabilidade genética, surgiram trabalhos apresentando alternativas, visando à otimização do processo de multiplicação *in vitro* de mudas de bananeira (CAMOLESI et al., 2010). Desta maneira, estudando a consistência do

meio de cultivo Camolesi et al. (2010), obtiveram bons resultados utilizando-se de meio líquido para multiplicação *in vitro* de mudas de bananeira cultivar Maçã. Aumentar o número de subcultivos não é um procedimento recomendado para aumentar o rendimento da quantidade de mudas em função do risco de variação somaclonal, (SANTOS & RODRIGUES, 2004). É importante também manter a concentração de fitorreguladores, notadamente as citocininas utilizadas na fase de multiplicação entre 1 e 5mg L⁻¹ (SOUZA et al., 1999).

A hipótese do presente trabalho, para aumento da taxa de proliferação, está baseada em, na fase de estabelecimento, proporcionar melhores condições fisiológicas para o desenvolvimento da cultura *in vitro*, para que na fase seguinte “proliferação ou multiplicação de brotações”, a cultura possa estar mais desenvolvida e consequentemente mais propensa à formação de novas brotações. De acordo com Tulmann Neto et al. (1989), o diâmetro dos rizomas revelou-se fator de grande importância no método de propagação *in natura*. Na variedade Maçã, rizomas com diâmetro de 8 a 11 cm produziram número baixo de brotos, enquanto que os diâmetros entre 17 e 20 cm originaram um maior número, processo este, que pode ser alvo de estudo também para estratégias de multiplicação *in vitro*. Segundo Rodrigues et al. (2004) reguladores de crescimento como o Paclobutrazol, pertencem a um grupo altamente ativo no controle do crescimento das plantas e possuem a capacidade de reduzir o crescimento. O Paclobutrazol atua na síntese da giberelina, impedindo as reações de oxidação antes da formação do GA₁₂-aldeído e inibindo a *ent*-caureno oxidase (TAIZ & ZEIGER, 2004), podendo assim, reduzir o crescimento da parte aérea e consequentemente resultar no aumento do rizoma, dando melhores condições a diferenciação das gemas laterais ou adventícias na fase de multiplicação.

Diante do exposto buscou-se, através do presente trabalho, quantificar a taxa de multiplicação de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, submetidos a alterações no protocolo de micropropagação, comumente utilizado em biofábricas, proporcionando aumento no tempo de cultivo na fase de estabelecimento de cultura, de 60 para 90 dias, mantendo o explante no mesmo meio de estabelecimento de cultura por 90 dias e, após os 60 dias de cultivo, efetuando transferências dos explantes para meios de cultura com modificações nas concentrações de sais e com adição de reguladores de crescimento, por mais 30 dias. Com o objetivo de selecionar meios alternativos para fase de multiplicação, que proporcionassem maior taxa de multiplicação, os explantes

provenientes da fase de estabelecimento de cultura, também foram testados em três meios de cultura diferentes, com variação na concentração hormonal e no estado físico (líquido e semi sólido).

2,0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento *in vitro* de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, submetidos a alterações no protocolo de micropropagação, comumente utilizado em biofábricas, visando maior taxa de multiplicação.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Na fase de estabelecimento de cultura

Avaliar o desenvolvimento das culturas *in vitro* de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, com alteração das variáveis:

- ✓ Aumento do tempo de cultivo de em 30 dias (60 para 90 dias).
- ✓ Aumento do tempo de cultivo em 30 dias com transferência a meios de cultura com modificação na concentração de sais, 50 % dos sais da formulação, e com acréscimo de regulador de crescimento, 1 e 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol.

2.2.2 Na fase de multiplicação

Avaliar o desenvolvimento e a taxa de proliferação de culturas *in vitro* de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, provenientes de tratamentos realizados na fase de estabelecimento de cultura com a utilização de três meios de cultura com variação de hormônios, ANA e BAP, e variação no estado físico do meio de cultura, sólido e semissólido.

2.2.3 Nas fases de enraizamento e de aclimatização

Quantificar o rendimento de culturas *in vitro* de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, submetidas às fases de enraizamento e aclimatização.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura da Bananeira

3.1.1 Classificação botânica e origem

A bananeira, da classe Liliopsida, subclasse Liliidae, superordem Lilinae, ordem Zingiberales (Scitamineae), família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, seção Eumusa (SILVA et al., 2002), é originada de cruzamentos interespecíficos entre *Musa acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, apresenta características das duas espécies. Mais de 1.000 cultivares são produzidas em todo mundo e representam grandes recursos econômicos e de alimentos em vários países em desenvolvimento (LI, LIN-FENG, 2013).

Por ser uma espécie tipicamente de clima tropical, exige para um bom desenvolvimento: calor constante (temperaturas entre 15 e 35°C), umidade elevada e adequada distribuição de chuvas. Com tais condições favoráveis, a bananeira (*Musa spp.*) é uma planta herbácea cultivada em várias regiões tropicais (SILVA et al., 2006).

A maioria das cultivares de bananeira tem como centro de origem o Sudeste Asiático, ainda que outros centros sejam considerados secundários, como África Oriental e ilhas do Pacífico (CASTRO et al., 2008). Estudos recentes de DNA sugerem que os ancestrais das atuais variedades de bananeira comestíveis foram cultivados em Papua Nova-Guiné e nas Filipinas, onde teriam se difundido e foram desenvolvidas por meio de vias complexas de geodomesticação (LI, LIN-FENG, 2013).

Segundo Moreira e Cordeiro (2006), a bananeira era cultivada pelas populações indígenas no Brasil à época de seu descobrimento, existindo pelo menos, duas variedades em cultivo semi-extrativista. Quando Pedro Álvares Cabral aqui chegou, observou que os indígenas alimentavam-se de bananas *in natura* de uma cultivar muito digestiva que se supõe tratar-se da “Branca” e outra, rica em amido, que precisava

ser cozida antes do consumo, chamada de “Pacoba”, que provavelmente seria a cultivar Pacovan. Com o decorrer do tempo, verificou-se que a “Branca” predominava na Região Litorânea e o “Pacovan”, na Amazônia (MOREIRA, 1999). Soluri (2008) descreve que a banana tenha sido trazida à América do Sul por viajantes polinésios, tendo sido propagada neste continente durante os séculos XVI e XVII.

3.1.2 Morfologia

A bananeira é uma monocotiledônea herbácea gigante, ou seja, a parte aérea é cortada após a colheita. Possui raiz, caule subterrâneo, folhas, flores, frutos e sementes.

É composta por caule subterrâneo (rizoma), de onde saem as raízes e o pseudocaule é formado por bainhas foliares, terminando com uma copa de folhas compridas e largas. A maioria das raízes origina-se na parte superior do rizoma e aparece logo abaixo do meristema central, cresce através da zona cortical, sai ao exterior e estende-se na camada superficial do solo. As raízes primárias são em forma de corda, brancas, “carnosas” e tenras quando novas; depois amarelecem; o seu diâmetro depende do cultivar e situa-se entre 5 a 8 mm, com um comprimento de 3 a 4 m; estas raízes têm numerosas radículas laterais com diâmetro de 2 mm aproximadamente, providas de pêlos absorventes que são responsáveis pela absorção da água e nutrientes. As raízes secundárias têm dominância apical, são em grande número, apresentam-se muito finas e são difíceis de ser observadas (BORGES et al., 2004).

O rizoma é o verdadeiro caule da bananeira. É um órgão subterrâneo, de formato aproximadamente cilíndrico que serve de apoio para a sustentação direta e indireta de todas as demais partes da planta. É revestido externamente por um tecido fino de coloração bastante escura com espessura de até 0,5 mm; internamente é formado pelo córtex e pelo cilindro central. O córtex é a camada mais externa do rizoma, é basicamente constituído pelo parênquima, tem consistência carnosa e espessura variando de 3 a 5 cm. Já o cilindro central é um tecido mais fibroso, mais interno, e a partir do qual saem às raízes e as gemas lateral e apical (HINZ & LICHTENBERG, 2004).

Um rizoma bem desenvolvido pode ter de 25 a 40 cm de diâmetro e ter de 6,9 a 11,5 kg, de acordo com o cultivar e a idade da planta (SOTO BALLESTERO, 1992). No rizoma, existe um conjunto de células meristemáticas denominadas gema apical de crescimento, responsáveis pelo desenvolvimento aéreo da planta (formação das folhas e das gemas laterais de brotações) (BORGES et al., 2004).

A gema apical de crescimento é responsável pela formação das folhas e das gemas laterais de brotação, e gera sucessivamente conjuntos de gemas e folhas. Moreira (1999) afirma inclusive que o rizoma possui tantas gemas laterais quanto foram as folhas geradas. Após gerar todas as folhas, a gema apical transforma-se em inflorescência que sobe verticalmente pelo interior do pseudocaule até “lançar” o cacho. À medida que o crescimento radial do rizoma ocorre, as gemas laterais vão se diferenciando, crescendo, e passando a ter as mesmas funções da gema apical de crescimento, originando assim um novo rebento (HINZ & LICHTENBERG, 2004). As folhas da bananeira são compostas pela bainha, pecíolo, lóbulos, nervura principal, nervuras secundárias e o aguilhão ou “pavio”. O desenvolvimento das folhas é iniciado a partir da gema apical que pode gerar de 30 a 70 folhas, dependendo do cultivar, sendo simultânea a formação da folha e da gema lateral de brotação. O aparecimento de uma nova folha ocorre a cada 7 a 11 dias e cada folha tem vida útil de 100 a 200 dias (BORGES et al., 2004).

A fixação das bainhas foliares no rizoma ocorre de forma concêntrica, gerando arcos cujas extremidades não se tocam. Internamente, a bainha possui numerosos espaços aeríferos corados por finos diafragmas, formando espaços que se prolongam até o limbo (SOTO BALLESTERO, 1992). Essa estrutura formada pela união das bainhas foliares é denominada pseudocaule, que pode atingir dimensões variáveis de 1,2 a 8,0 m de altura com 10 a 50 cm de diâmetro, formando uma estrutura resistente que suporta os limbos foliares e o cacho (MANICA, 1997).

O número de folhas, bem como o tamanho destas, influenciam no número de pencas e, conseqüentemente na massa do cacho, pois tais medidas das folhas representam uma maior ou menor superfície fotossintética; sendo adequado para uma boa produção o número de 12 folhas funcionais na ocasião da emissão da inflorescência e no mínimo nove no momento da colheita (HINZ & LICHTENBERG, 2004). Após, a planta emite no centro da copa uma inflorescência com brácteas ovaladas de coloração normalmente roxo avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. De cada conjunto de flores, formam-se as pencas (7 a 15), apresentando número variável de frutos (40 a 220) dependendo da variedade. Esta inflorescência é uma extensão do rizoma ou caule subterrâneo. Após a gema vegetativa apical se diferenciar em gema floral, não há mais formação de folhas e o crescimento da planta cessa. Entretanto, esta sobrevive pela formação de novos rebentos na sua base.

3.1.3 Importância socioeconômica

Dentre as frutas, a banana destaca-se como a segunda fruta mais produzida no mundo, com uma produção de 101,993 milhões de toneladas, perdendo apenas para a melancia, que ocupa a primeira colocação com 105,372 milhões de toneladas (FAO, Agosto de 2014). É cultivada em mais de 130 países, sendo o continente asiático que lidera a produção, seguido do continente americano. Na maioria dos países produtores, a exploração da bananicultura tem se expandido bastante, praticamente triplicando o volume produzido, passando de 35 milhões de toneladas na safra 1978 para 102 milhões de toneladas na safra 2012.

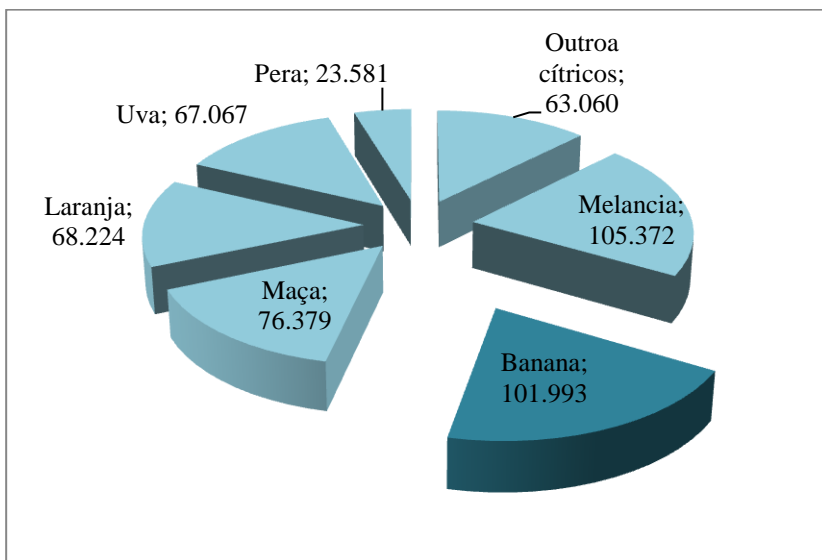


Figura 1 - As frutas mais produzidas no mundo (2012 – toneladas)

Fonte: Adaptado de EPAGRI/CEPA, 2014

A Índia permanece liderando a produção no ranking mundial, sendo responsável por 24,4%. Em seguida, vêm a China, com 10,3%; Filipinas, com 9,1%; Equador, com 6,9%; Brasil, com 6,8% e Indonésia, com 6,1,7%. De 2008 para 2012, entre os dez maiores produtores mundiais, apenas a Índia e o Brasil tiveram decréscimo de produção. Angola e China apresentaram os maiores crescimentos neste período, com 14,80% e 7,72%, respectivamente (EPAGRI/CEPA, 2014).

Apesar de o Brasil apresentar um decréscimo em produtividade no último ano, é uma cultura que vem se desenvolvendo positivamente em nível nacional. Segundo Lichtemberg (2011), a bananicultura brasileira passou por transformações a partir do século passado, com o início das exportações do litoral paulista para o mercado platino e europeu, havendo a mudança do simples semi-extrativismo para uma bananicultura com uso de técnicas agronômicas de manejo cultural, adubação e fitossanidade.

A evolução da bananicultura brasileira foi possível em virtude dos progressos obtidos no que se refere à disponibilidade de material genético diversificado, à disponibilidade de mudas sadias e de boa qualidade genética, às práticas culturais de manejo pré e pós-colheita, às técnicas fitossanitárias desenvolvidas, às técnicas de nutrição de irrigação, e a melhoria do nível técnico e organizacional do bananicultor brasileiro. Assim, no Estado de São Paulo, por exemplo, apesar de uma pequena redução da área cultivada, houve a manutenção da produção estadual, devido ao aumento da produtividade (MORAES et al., 2010)

O Brasil é o 5º maior produtor mundial de bananas. Pelo clima favorável, a bananeira é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros. Isso permite produção e comercialização escalonadas durante todo o ano, atendendo de forma regular as necessidades de consumo (EPAGRI/CEPA, 2014).

A safra brasileira 2013 de bananas apresentou uma área colhida de 485,559 mil hectares, quantidade de 6.947.786 ton. e rendimento médio de 14,309 ton/ ha. Para 2014, estimou-se uma área plantada de 490,1 mil hectares, resultando numa produção de 7,18 milhões de toneladas. Como ao longo dos sete primeiros meses de 2014 houve falta ou excesso de chuvas, com inundações, temperaturas negativas ou extremamente altas, queda de granizo, vendavais, houve prejuízo no desempenho dos bananais, tanto no rendimento médio quanto na qualidade da fruta. Ainda assim, as vendas da banana transcorreram dentro do programado, atendendo as expectativas dos segmentos de produção e comercialização.

No que diz respeito às exportações brasileiras, de janeiro a julho de 2014, no período alcançou-se um volume de 55.100 toneladas, no valor de US\$ 21,6 milhões. Uma peculiaridade das exportações brasileiras é que os estados das regiões Sul e Sudeste destinam a produção, principalmente, para os mercados argentino e uruguaio, enquanto o Rio Grande do Norte e o Ceará preferem o mercado europeu, destacando-se a Alemanha, o Reino Unido, a Espanha e a Holanda.

Esses mercados, além de mais seguros, garantem ao setor melhores resultados financeiros.

As estimativas da safra brasileira para 2014 revelam o estado da Bahia com a maior área colhida e maior produtividade (78.797 hectares e 1.195.610 toneladas, respectivamente) e Santa Catarina ocupando a 7ª colocação em área colhida, porém com a 4ª colocação em produtividade (29.154 ha e 649.609 t, respectivamente), fato este que credencia Santa Catarina a 3ª colocação em termos de rendimentos/ha, com 22,282 Kg/ha (IBGE, 2014).

Em se tratando do estado de Santa Catarina são aproximadamente seis mil produtores que exploram essa atividade, se concentrando em duas regiões. No Litoral Norte Catarinense, com 85% da produção estadual, concentram-se os cultivares Nanica e Nanicão (tipo Caturra). No Litoral Sul, com 9% da produção, os cultivares mais usados são a Enxerto e a Branca de Santa Catarina (tipo Prata). Dez municípios respondem por mais de 80% da produção estadual, sendo nove do Litoral Norte Catarinense: Corupá (24% da produção estadual), Luiz Alves (18,4%), Massaranduba (8,2%), Jaraguá do Sul (6,9%), São João do Itaperiú (5,4%), Schroeder (4,6%), Garuva (3,8%), Guaramirim (3,7%), Joinville (3%) e apenas Jacinto Machado (3,3%) do Litoral Sul (Epagri/Cepa, 2014).

Com relevância social, no Brasil, praticamente toda a produção de banana é consumida *in natura* e o seu cultivo tem papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural. A banana constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo alto valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Sabe-se que uma banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C recomendada diariamente para crianças. Contém, ainda, vitaminas A e B, muito potássio (K), pouco sódio (Na) e nenhum colesterol. Além do elevado valor nutritivo, a banana tem alto significado socioeconômico, pois mobiliza um grande contingente de mão-de-obra, permite retorno rápido ao produtor e é geradora de divisas para o País (GANGA, 2002).

Alves (2001) relata que, em países da África, a banana tipo Terra constitui o alimento básico em algumas regiões produtoras, com importância equivalente à mandioca, milho ou inhame; na maioria dos países da América Latina e Caribe é mais consumido em pratos salgados e no Vale de Cauca, na Colômbia, seu consumo chega a superar os 300 kg/habitante/ano.

A bananicultura gera cerca de um emprego direto e quatro empregos indiretos para cada três hectares cultivados, a depender do nível tecnológico adotado (ALVES, 1991). Tomando esses valores

como referência e utilizando as estimativas para a safra de 2014 no Brasil, podemos inferir que a atividade gera, aproximadamente, 490.000 empregos diretos e 1.470.000 empregos indiretos, sendo, portanto, uma atividade estratégica, principalmente se considerarmos que as principais áreas produtoras se localizam em regiões carentes em alternativas de emprego e geração de renda, justificando investimento em conhecimento e difusão de informações que possam melhorar as condições de cultivo.

3.1.4 Recursos genéticos disponíveis

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram principalmente as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, de modo que cada cultivar pode conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies. Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), cujas combinações resultam grupos diplóides (AA, BB e AB), triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, AB BB) (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007).

Assumindo, que no início, a bananicultura brasileira contava com apenas duas variedades: Branca e Pacovan, destas originaram-se, por mutação natural, novas variedades. A “Branca” originou todas as variedades do subgrupo Prata (MOREIRA; CORDEIRO, 2006), de forma direta, como no caso da “Prata”, da “Prata-Anã” (enxerto) e da “Prata-Catarina”, ou de forma indireta, como no caso da “Pacovan” e da “Prata-Gorotuba”. Muitas outras variedades foram introduzidas no Brasil, como “Maça”, a “Figo”, a “Ouro” e a Nanica, que aqui originou por mutação, de forma direta ou indireta, as variedades brasileiras do subgrupo Cavendish (MOREIRA; CORDEIRO, 2006), como a “Nanicão” a “Caturrão” e outras. No século passado, foram introduzidas novas variedades do subgrupo Cavendish, como a Willians, Grande Naine, Gross Michel e Mysore, com o objetivo de aumentar a produtividade dos banais, de diversificar nosso material genético ou de enfrentar problemas fitossanitários (LICHTENBERG, 2011)

3.1.5 Principais Cultivares

As cultivares de bananeira mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maça, Mysore, Terra e D’Angola, do grupo AAB, utilizadas unicamente para o mercado interno; e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usadas principalmente para exportação.

Em menor escala, são plantadas a “Ouro” (AA), a “Figo Cinza” e a “Figo Vermelho” (ABB), a “Caru Verde” e a “Caru Roxa” (AAA). As variedades Prata, Prata Anã e Pacovan são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com banana no Brasil (SILVA et al., 2004).

Contudo, apesar do grande número de cultivares existentes no Brasil, são poucas que apresentam potencial agrônomo para exploração comercial, tais como: alta produtividade, tolerância a pragas e doenças, porte reduzido, ciclo de produção menor e que apresentem frutos com boas características pós-colheita e organolépticas (RAMOS et al., 2009).

As bananas “Pacovan”, “Prata”, “Terra” e Mysore apresentam porte alto. A banana “Maçã” é altamente suscetível ao mal-do-panamá; as cultivares Nanica, Nanicão, Grande Naine, Terra e D’Angola apresentam alta suscetibilidade aos nematoides; e a “Mysore” está infectada com BSV (*Banana streak vírus*, agente causal das estrias-da-bananeira). Todas essas cultivares são suscetíveis ao moko e, à exceção da “Mysore”, são também susceptíveis à sigatoka-negra (BORGES et al., 2006).

3.1.5.1 Cultivar Grande Naine

A cultivar Grande Naine, com os sinônimos “Gran Enano” e “Grand Naine”, do grupo genômico AAA e subgrupo Cavendish. Tem características de aceitação pelo mercado, produtividade, e resistência às pragas e doenças muito semelhantes à cultivar Nanicão. Sua planta, seu cacho e seus frutos também são bastante parecidos aos da Nanicão. Seu fruto, porém, é um pouco mais reto, devido à maior proximidade entre as pencas. É uma bananeira de porte médio, com 2,00 a 3,40 metros de altura, um pouco mais baixa que a Nanicão. Suas folhas são mais juntas e mais caídas do que as da Nanicão. Atualmente é a bananeira mais cultivada em diversos países produtores de banana e uma das mais procuradas para plantio em Santa Catarina. É altamente suscetível à sigatoka-amarela, suscetível à sigatoka-negra e altamente resistente ao mal do Panamá (EPAGRI, 2013).

3.1.5.2 Cultivar Prata Catarina

Trata-se de um clone do cultivar Enxerto, oriundo de variação natural no campo, coletado em 1997, na comunidade de Retiro da União, em Santa Rosa do Sul, SC. Apresenta maior resistência ao mal

do panamá e à “fuligem do fruto” do que o Enxerto. O tamanho e a coloração dos frutos também são comparativamente melhores. É chamada também de Prata Catarina. É moderadamente suscetível à sigatoka-amarela e moderadamente resistente ao mal-do-panamá. (EPAGRI, 2013)

3.2 Métodos de Propagação da bananeira.

A bananeira pode ser propagada de forma sexuada (através de sementes) ou assexuada (vegetativamente por meio de mudas). Nos plantios comerciais, utiliza-se a propagação vegetativa, devido a sua eficiência e por proporcionar maior rendimento (ALVES et al., 2004).

3.2.1 Propagação por meio de sementes

As bananeiras que apresentam frutos comestíveis geralmente não produzem grãos de pólen férteis e os ovários das flores femininas dificilmente podem ser fecundados, devido a um atrofiamento do estigma que impede a passagem do pólen. Entretanto, em casos raros, este atrofiamento pode não ocorrer e a fecundação se processa normalmente, surgindo desta forma sementes férteis (MOREIRA, 1999). Desta forma a propagação da bananeira por meio de semente só é realizada para fins de melhoramento genético, uma vez que as bananas se formam naturalmente por partenocarpia (sem fecundação).

3.2.2 Propagação vegetativa

Na natureza a multiplicação ocorre normalmente, por via vegetativa, através da emissão de brotações. Seu ciclo de vida inicia com a formação da primeira brotação “filho”, que aparece ao nível do solo, a partir daí, este broto cresce, formando a bananeira, que vai emitindo folhas até a floração. A inflorescência vai desenvolvendo-se, forma-se o cacho, as frutas desenvolvem-se e caem. A partir deste ponto a planta mãe morre, dando lugar ao desenvolvimento das brotações menores. O ciclo é contínuo (LICHTENBERG et al., 2002).

Essas mudas são classificadas de acordo com seu estágio de desenvolvimento, sendo denominadas e chifre, chifrinho, chifirão, pedaço de rizoma, rizoma adulto e guarda-chuva (NAKAYAMA, 2012).

De acordo com Nakayama (2012), as mudas de bananeira são classificadas, de acordo com seus estágios de desenvolvimento, como:

- a) Chifrinho: são mudas com 30 a 40 cm de altura e folhas lanceoladas;
- b) Chifre: são mudas com 50 a 60 cm de altura e folhas lanceoladas;
- c) Chifrão: são mudas com 60 a 150 cm de altura, folhas lanceoladas e com características de plantas adultas;
- d) Pedaco de rizoma: são frações de rizomas que contém pelo menos uma gema intumescida e com peso a partir de 800 gramas
- e) Rizoma adulto: são mudas de rizomas bem desenvolvidos, mas ainda jovem e sem presença de gemas visíveis;
- f) Guarda chuva: são mudas com folhas adultas, com rizomas pequenos e apresentam ciclos reprodutivos mais longos e sem utilização comercial.

Tradicionalmente, a bananeira (*Musa spp.*) é propagada vegetativamente, porém as taxas de multiplicação são baixas, além de resultar em mudas desuniformes, dificultando o manejo do pomar, e podendo ainda se constituir em um mecanismo de disseminação de pragas e doenças, tais como mal-do-panamá, moko, podridão-mole, broca, nematoides e vírus (ROELS et al., 2005). Uma bananeira pode produzir tantas mudas quantas forem as folhas emitidas. Outros fatores como: variedade, porte da bananeira, idade da planta mãe, tem sido preponderantes para determinação do número de rebentos emitidos, até o surgimento do cacho, o que resulta na produção de 9 a 10 mudas, em período geralmente superior a 12 meses, em condições de campo, e nem todas são de boa qualidade (BORGES et al., 2004).

Objetivando aproveitar ao máximo a potencialidade da bananeira de produzir brotações, através das gemas vegetativas, os avanços conquistados no campo da fisiologia vegetal nos últimos 40 anos, proporcionaram o desenvolvimento de tecnologias de propagação alternativas aos métodos convencionais através da cultura de tecidos (FLORES, 2003).

Têm-se aplicado diversas metodologias para a propagação da cultura com o princípio de induzir brotações das gemas e acelerar o processo de desenvolvimento. Comparando-se os diferentes métodos de propagação vegetativa com relação ao número de mudas obtidas e ao tempo gasto na produção das mesmas, verifica-se que a obtenção de mudas via micropropagação é muito superior que os demais processos. Enquanto no processo convencional são necessários 12 meses para obtenção de 10 a 30 mudas, dependendo do genótipo utilizado, cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo mediante a micropropagação (Tabela 1).

Tabela 1. Número de mudas e período necessário para obtenção de plantas a partir de diferentes métodos de propagação da bananeira.

Método	Número de mudas (varável de acordo com o genótipo)	Período (meses)
Processo convencional	10 a 30 mudas/ planta	12
Fracionamento do rizoma	4 a 12 mudas/ rizoma	6 a 8
Propagação rápida	10 a 50 mudas/ rizoma	5 a 6
Micropropagação	150 a 300 mudas/ ápice isolado	6 a 8

Fonte: Adaptado de Santos-Serejo et. al., 2009.

3.2.2.1 Métodos de Propagação convencional

No método de propagação convencional, *in natura*, a eliminação das folhas basais facilitando a exposição das gemas do rizoma, também chamada de descorticação, bem como o seu tratamento são práticas importantes para a manutenção da sanidade do bananal. O diâmetro inicial dos rizomas revelou-se fator de grande importância no método de propagação *in vivo*. Na variedade Maçã, rizomas com diâmetro de 8 a 11 cm produziram número baixo de brotos, enquanto que os diâmetros entre 17 e 20 cm originaram um maior número (TULMANN NETO et al., 1989).

Nakayama (2012), descreveu os seguintes tipos de propagação convencional:

a) As mudas dos tipos “chifrinho”, “chifre” e “chifrão”, devem ser separados do rizoma mãe, em seguida realizar a retirada das raízes e solos aderidos ao rizoma e fazer a imersão das mudas descortçadas (sem a casca) em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos. As mudas do mesmo tipo devem ser plantadas na mesma área de forma a uniformizar quanto à germinação e colheita.

b) Fracionamento do rizoma: arrancar o rizoma do campo após a colheita do cacho, realizar a limpeza das raízes e partes necrosadas, cortar o rizoma em função das gemas expostas, e realizar o tratamento dos pedaços cortados em solução de Hipoclorito de sódio a 5%, durante 10 minutos. Plantando os pedaços de rizoma em canteiro de areia: abrir sulcos em leiras, enterrar os pedaços com as gemas para cima e irrigar diariamente, ou cobrir com plástico transparente de forma a manter a

umidade da areia e molhar semanalmente. As mudas estarão prontas para o plantio a partir de quatro meses.

c) Rizoma inteiro invertido: o rizoma de um a dois quilos de massa, após ser retirado do solo, descortçado e tratado com solução de hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos, poderá ser plantado na posição invertida com o pseudocaule no fundo da cova, que elimina a dominância apical e propicia a saída das gemas.

d) Viveiro de mudas no campo: as mudas aclimatadas, com 30 cm de altura, ou mudas cônicas (chifre, chifrinho e chifrão) poderão ser plantadas em covas corrigidas e adubadas de maneira que o colo da muda fique cinco centímetros abaixo do solo, no espaçamento de 1 a 1,5 m entre plantas e 2 a 2,5 m entre linhas. Aproximadamente aos 120 dias a planta da bananeira deve ter o pseudocaule cortado a 10 cm do solo, eliminando a dominância apical e com isso favorecer a indução das brotações de gema lateral.

e) Propagação rápida: A principal vantagem desta técnica é a de produzir muda em maior quantidade em relação aos métodos anteriormente citados, além de uma boa qualidade fitossanitária das mudas desde que os rizomas sejam livres de doenças. Para este método torna-se necessário o uso de telados ou viveiros. Após a coleta da muda no campo, é promovida a desinfestação. Em seguida retiram-se as bainhas foliares até exposição da gema apical e plantio superficial em areia lavada e esterilizada, em recipiente móvel e cobertura com saco plástico transparente (GANEM, 2008). Após esta etapa, elimina-se a gema apical assepticamente com lâmina afiada, quebrando a dominância apical, favorecendo o desenvolvimento de gemas laterais. Retiram-se as bainhas das gemas laterais com lâmina desinfetada com álcool, expondo o meristema vegetativo. Com isso inicia-se a formação de calo e brotos. Retiram-se os brotos de no mínimo 15 cm. Os brotos devem ser plantados em recipiente de 300 mL aproximadamente, com substrato esterilizado, composto de terra vegetal, areia, esterco e pó de serra na proporção de 1:1:1:1 e levados à câmara úmida até emitirem folhas novas e raízes. Finalmente as mudas são transferidas para sacos de polietileno com 4 kg da mesma mistura utilizada anteriormente para a aclimatização antes do plantio no campo (GANEM, 2008).

3.2.2.2 Método de Micropropagação.

A micropropagação é uma técnica de propagação massal de plantas em condições de laboratório, em meio nutritivo específico, sob condições assépticas e ambiente controlado.

Trata-se de uma ferramenta biotecnológica que utiliza partes vegetais (explantos) cultivados em uma mistura de elementos (meio de cultura) suficientes para, em ambiente asséptico (*in vitro*) e em condições controladas (temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa), desenvolver plantas inteiras e fazê-las propagarem vegetativamente de forma rápida e eficiente (DEBIASI, 2010). Tudo isso se faz possível pelo fato das células vegetais possuírem totipotência celular, ou seja, cada célula de um vegetal possui a capacidade de regenerar um indivíduo completo, proporcionando a produção de milhares de plantas idênticas à planta mãe.

O princípio de regenerar novas plantas a partir de um único propágulo se baseia na ativação do crescimento de gemas axilares presentes na inserção das folhas na base do rizoma, por meio de balanço hormonal (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009).

A obtenção de plantas pela técnica de micropropagação pode ser realizada por meio de três rotas morfogênicas, sendo elas: a proliferação de gemas; a organogênese, subdividida em adventícia direta e indireta; e a embriogênese somática, que também pode ocorrer de forma direta ou indireta (CHAWLA, 2004).

a) A proliferação de gemas baseia-se na multiplicação por meio da proliferação e crescimento de meristemas pré-existent na planta. De um lado, a cultura de meristemas consiste no estabelecimento *in vitro* do tecido meristemático apical sem os primórdios foliares. Por outro lado, a cultura de ápices caulinares consiste no estabelecimento *in vitro* a partir de brotações apicais maiores do que aquelas utilizadas para iniciar a cultura de meristema, tendo alguns primórdios foliares. A cultura de segmentos nodais consiste no cultivo de gemas laterais isoladas ou segmentos de caule com uma ou múltiplas gemas (CHAWLA, 2004).

b) A organogênese consiste na formação de órgãos a partir de células e tecidos vegetais, como segmentos de folhas, raízes e segmentos internodais. A organogênese pode ocorrer de forma direta, na qual há a emergência de órgãos adventícios diretamente do explante, a partir de gemas adventícias; ou indireta, onde novas gemas e eixos caulinares são induzidos e formados a partir de tecidos não organizados, denominados calos, originados de explantes de diferentes origens (CHAWLA, 2004; LEMOS, 2010).

c) A embriogênese somática consiste na regeneração de embriões a partir de células somáticas. É o processo pelo qual novos indivíduos se originam a partir de células simples, caracterizando-se por não serem produtos da fusão de gametas e que não apresentam conexões vasculares com os tecidos maternos (ULISSES et al., 2010). A embriogênese

somática pode ocorrer de forma direta, onde os embriões somáticos se originam diretamente dos explantes, sem o estabelecimento de estádios intermediários de calos; ou de forma indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico (CHAWLA, 2004).

Na metodologia para produção de mudas micropropagadas são etapas importantes:

A escolha do material vegetal - preferencialmente de plantas matrizes de bananeira em excelente estado fisiológico, nutricional e sanitário, vigorosas e que possuam o Certificado de Origem para garantir a fidelidade genética do genótipo que vai ser multiplicado (SANTOS-SEREJO et al., 2009). Geralmente as plantas matrizes possuem características agrônômicas superiores e recebem tratamento fitossanitário, nutricional e hídrico, para aumentar a probabilidade de sucesso nos estágios seguintes da micropropagação (ULISSES et al., 2010).

A fase de estabelecimento dos explantes em meio nutritivo - nesse estágio retira-se um segmento de tecido (explante) da planta matriz, desinfesta-se e inocula-se em meio nutritivo, sob condições assépticas. A desinfestação do material vegetal é um fator importante na introdução da cultura *in vitro*. Se essa etapa não for realizada adequadamente, todo o processo pode ficar comprometido pela ocorrência de contaminação por fungos e bactérias. (CARVALHO et al., 2012). Quanto maior for o tamanho do explante, maior será a possibilidade de ocorrência de contaminações (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

A fase de proliferação ou multiplicação das brotações - Para propagação *in vitro*, utilizam-se principalmente gemas apicais e axilares, além de brotações laterais para realizar os sucessivos subcultivos. Segundo Resmi e Nair (2011), a taxa de multiplicação é o fator mais importante no processo de micropropagação. O número de subcultivos, além de outros fatores como o genótipo, via morfogênica, tipo de explante e componentes do meio de cultivo utilizado, tem influência sobre a estabilidade genética das plantas obtidas. Quanto maior for o número e o tempo de duração de cada subcultivo, maior será a probabilidade de ocorrência de plantas com alterações genéticas, ou seja, de variantes somaclonais (SANTOS-SEREJO et al., 2009; KHAN et al., 2011).

A fase de enraizamento e alongamento das brotações - após a fase de proliferação ou multiplicação, as brotações devem ser individualizadas e transferidas para um meio novo de forma que possam alongar e enraizar (CARVALHO et al., 2012);

Aclimatização das mudas micropropagadas – é a retirada das plantas da condição *in vitro* e transferência para substrato *ex vitro*, em condições controladas de umidade elevada e luminosidade reduzida. A aclimatização é necessária porque as mudas produzidas *in vitro* apresentam tamanho reduzido, necessitando de uma etapa intermediária entre a produção da muda em laboratório e o plantio no campo (CARVALHO et al., 2012).

De acordo com Wilken et al. (2014), devido a transmissão de doenças aos bananais e a uma escassez de material vegetal de qualidade fitossanitária disponível aos agricultores, o interesse por técnicas de micropropagação para a produção de mudas vem aumentando. O desenvolvimento de técnicas *in vitro* permite a rápida propagação clonal, a regeneração e a multiplicação, porém, os custos de produção elevados limitam geralmente o uso comercial, devido a ineficiências do sistema.

A produção em larga escala de mudas de bananeira tem sido realizada em laboratório mediante a técnica da micropropagação a partir de ápices caulinares e/ou gemas laterais, nos quais é induzida a formação de novas brotações, em condições de cultivo controladas. Esta técnica vem sendo utilizada de maneira crescente para a bananeira nos últimos anos com a instalação de diversos laboratórios comerciais, permitindo, assim, a aquisição de mudas micropropagadas de melhor qualidade pelos agricultores, tanto dos cultivares tradicionais quanto dos novos híbridos desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético (CASTRO et al., 2009).

Mudas micropropagadas apresentam maior taxa de sobrevivência e, na maioria das vezes, demandam menor aplicação de insumos para o controle de pragas e doenças, no campo, além de crescerem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento do que as mudas convencionais (LEE, 2006). Além disso, são precoces na emissão de brotações e produzem mais mudas por ano (PEREIRA et al., 2001).

Singh et al. (2011) enfatizam que as mudas provenientes da cultura de tecidos, em comparação com as mudas convencionais, apresentam crescimento e desenvolvimento mais uniforme dos frutos e possibilitam programação de colheita, que pode ser antecipada em 60 a 70 dias. Além de maior precocidade, as plantas são mais produtivas e a

uniformidade de produção facilita os tratos culturais (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009).

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, há deficiência de trabalhos que visam o aumento da taxa de multiplicação de alguns cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção (PEREIRA et al., 2013).

3.3 Fatores que afetam a micropropagação de plantas

3.3.1 Oxidação

Existem alguns fatores que limitam, em parte, o processo de micropropagação de alguns cultivares de bananeira e que interferem principalmente na taxa de multiplicação, entre os quais, temos a alta taxa de oxidação dos explantes, a qual é caracterizada pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultivo, influenciando na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado (OLIVEIRA, 2010).

A oxidação é causada pela reação das polifenoloxidasas sobre compostos fenólicos e, no caso da bananeira, pode levar os ápices caulinares a morte, nas fases iniciais de desenvolvimento ou prejudicar o desempenho da fase de multiplicação (SOUZA et al., 2000; VUYLSTEKE e LANGHE, 1985).

O estabelecimento das culturas *in vitro* podem apresentar melhores resultados quanto à intensidade de oxidação caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo, mesmo após este período, o cultivo em condições de luminosidade intermediária contribui para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento do explante (DURAND-CRESSWELL et al., 1982).

A oxidação fenólica pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos nos explantes, pela modificação de ambientes, e/ou pelo uso de antioxidantes (BASSAN et al., 2006). Na redução dos danos mecânicos e químicos ao explante, durante a excisão e esterilização, devem-se tomar os devidos cuidados para que os danos físicos e químicos ao explante sejam minimizados.

3.3.2 Dominância apical

Os eventos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento que ocorrem nas plantas representam um processo integrado, complexo e pouco conhecido. A interdependência dos eventos metabólicos reflete no desenvolvimento da planta como um todo. Uma característica de várias espécies de plantas é o desenvolvimento relativamente muito limitado de muitos meristemas laterais. Estes aparentemente permanecem como reserva para o caso de destruição da gema apical de crescimento. Esta pode exercer um controle forte ou fraco sobre os meristemas laterais (ZAFFARI, 1998; CASTRO, 1983). No caso da dominância apical, o controle exercido pelo ápice caulinar sobre o crescimento das gemas laterais, ramos e folhas é influenciado, em diferentes graus, por fatores ambientais, genéticos e fisiológicos.

A gema apical do rizoma da bananeira, a exemplo do que ocorre com todas as demais plantas superiores, é responsável pela síntese de auxinas, tendo como principal o ácido indol acético e pelo controle da formação e desenvolvimento das gemas axilares (SACHS, 1991).

O controle da gema apical sobre os meristemas laterais é exercido através de uma auxina, possivelmente o AIA (ácido indol acético) onde sua maior concentração na gema apical inibe o desenvolvimento das gemas axilares (TAIZ & ZEIGER, 2002), por atuar como um dreno de nutrientes e citocininas para a gema apical. Além disso, o elevado nível de auxina nas gemas apicais auxilia na manutenção de altos níveis de ABA (ácido abscísico) nas gemas laterais, inibindo o crescimento dessas (TAIZ & ZEIGER, 2002).

Os hormônios vegetais estão diretamente relacionados com os fatores que afetam a dominância apical e a hipótese do controle hormonal do desenvolvimento de gemas axilares pelo meristema apical sempre esteve entre as mais aceitas, sendo a auxina o principal hormônio envolvido nesse processo (DEBIASI et al., 2000).

De acordo com Dantas (1988), na bananeira, os brotos somente iniciam o desenvolvimento a partir do surgimento dos primórdios da 9ª à 11ª folha, estando sujeitos a uma forte dominância apical.

A influência dos fatores endógenos no processo de indução da divisão celular na formação de meristemas e desenvolvimento de gemas axilares (ou laterais) após a eliminação da dominância apical, levando à perda da dormência (quebra da dormência) dos mesmos, é um dos modelos mais estudados nos fatores que afetam o ciclo celular.

A quebra da dormência de gemas resulta na ativação da expressão de genes nas transições G1/S e G2/M do ciclo celular, a partir da ação

de substâncias que atuam como sinalizadoras do ciclo celular (fitormônios, açúcares) e que irão regular a atividade de complexos específicos CDCs/ciclinas (STALS & INZÉ, 2001).

O processo de eliminação da dominância apical, e consequentemente do desenvolvimento de gemas, resulta no aumento das divisões celulares e mudanças no programa de desenvolvimento dos primórdios de gemas axilares, sugerindo que esses dois processos são regulados por fatores em comum (SOUZA, 2006). Nas plantas, células que não estão em processo de divisão, podem estar estacionadas tanto em G1, quanto em G2. Na maioria dos casos, as células meristemáticas de gemas dormentes estão estacionadas na fase G1, anterior à replicação da fase S. Assim, a quebra da dormência resulta no aumento da expressão de genes da fase G1/S, como ciclinas do tipo D e histonas, seguindo-se na fase G2/M com o aumento na expressão de ciclinas do tipo B (HORVATH et al., 2003).

3.3.3 Variação somaclonal

Álvares (2002) define o fenômeno da variação somaclonal como uma variabilidade genética gerada durante a cultura *in vitro*. A variação somaclonal corresponde ao aparecimento de plantas anormais durante o processo de multiplicação, principalmente relacionado à estatura, cor, forma e arquitetura das folhas e má formação dos cachos. Sahijram et al. (2003) definem variação somaclonal como um tipo de variação no fenótipo de plantas regeneradas por cultura de tecidos. Esta variação pode ser de origem genética ou epigenética, que dependendo da cultivar, pode levar a morfologia do tipo anã, gigante, variegada e folhas lanceoladas, entre outras.

A ocorrência de variação genética durante o processo de cultivo *in vitro*, ou seja, variação somaclonal, é indesejável quando se pretende propagar ou conservar germoplasma. Na maioria dos casos, as anormalidades estão relacionadas, principalmente, à estatura da planta, coloração do pseudocaule e pecíolo, arquitetura das folhas e formação dos cachos (DANIELLS et al., 2001), sendo, portanto, indesejáveis agronomicamente.

O conhecimento dos mecanismos que causam a variação somaclonal e, consequentemente, dos procedimentos adequados para evitar sua ocorrência, bem como o desenvolvimento de métodos de detecção precoce, são fatores importantes para a produção de mudas micropropagadas com qualidade. A taxa de variação somaclonal pode ser afetada por diversos fatores, como tipo de explante, via

morfogenética, reguladores de crescimento, duração e número de ciclos de subcultivo (acima de 5-6 subcultivos), entre outros (CÔTE et al., 1993; BAIRU et al., 2006). Para obtenção de mudas de bananeira da cv. Pacovan com qualidade genética deve-se micropropagar um ápice caulinar até cinco subcultivos (SANTOS, et al., 2004).

A maioria das variações somaclonais observadas no subgrupo Cavendish (AAA) são para alterações no porte, anão ou gigante, o que está associado com a sensibilidade ao ácido giberélico (REUVENI et al., 1996). Segundo Santos e Rodrigues (2004), as variantes mais encontradas em mudas microrpropagadas da variedade 'Pacovan' foram: Variante de cacho que se caracteriza por apresentar a planta com as propriedades morfológicas normais da cv. Pacovan, como altura da planta, coloração e forma das folhas e pseudocaule, exceto pela conformação do cacho; Variante variegada que se caracteriza por apresentar variegações em todas as partes da planta, das folhas ao pseudocaule incluindo o cacho. Os descendentes apresentaram o mesmo tipo de variação dessa planta que revelou potencial para ornamentação; Variante morfológica da forma da folha associada a uma variação da clorofila na folha que se caracteriza pelo estreitamento do limbo foliar com um afilamento pronunciado na ponta da folha, deixando-a com forma lanceolada. Associada a essa característica, um dos lados da folha, geralmente o direito para quem vê a folha pela face inferior, é menor e com variegações acompanhando toda a extensão de sua borda. Em sua face superior, observam-se pequenas manchas de coloração negra semelhante a queimaduras. A extremidade da borda que circunda toda a folha é ligeiramente mais grossa, dando um aspecto serrilhado a essa estrutura. A área foliar é menor que uma folha de planta normal; Variante da coloração do pseudocaule que se caracteriza por apresentar coloração negra e brilhante no pseudocaule, acompanhando o engajo em tom opaco até chegar às flores. Fica bem evidente a diferença da coloração quando comparada ao controle que possui tonalidade verde-clara e opaca.

Santos et al. (2004), em trabalho realizado com mudas microrpropagadas de Musa da cv. Pacovan observaram que até em cinco subcultivos (F5) não houve a ocorrência de variantes e que a partir do 6º subcultivo (F6) foram detectadas variantes (4,8%), atingindo o máximo de 5,8% em nove subcultivos (F9). Desta forma identificou que a porcentagem de variação somaclonal aumenta com o número de subcultivos e, portanto, as biofábricas devem limitar o número de subcultivos para obtenção de mudas de alta qualidade genética.

Segundo Scherwinski-Pereira et al. (2009), atualmente existem laboratórios (biofábricas), tanto no Brasil quanto em outros países, que utilizam a micropropagação com taxas de variações somaclonais nas mudas inferiores a 2%.

3.4 Biofábricas de produção de mudas de bananeira

A aplicação de cultura de tecidos de plantas para vários fins biotecnológicos dependerá cada vez mais da adoção de princípios de engenharia e da interação com sistemas biológicos. Laboratórios comerciais deverão produzir um grande número de plantas de alta qualidade com eficiência e baixo custo. Utilizada em grande escala de produção, técnicas de cultura de tecidos são frequentemente criticadas por causa das exigências de trabalho intensivo (WILKEN et al., 2014).

Recentemente, tem-se empregado o termo “biofábrica” para as empresas que produzem e comercializam mudas micropropagadas. Segundo Gerald e Lee (2011), uma biofábrica de plantas pode ser definida como um laboratório de cultura de tecidos vegetais que produza maciçamente *in vitro* determinada quantidade de mudas e cujo processo de produção esteja bem definido.

Em relação à bananeira, o número de biofábricas dedicadas à produção de mudas vem crescendo a cada ano, em 2012 já era 91,7% a mais do que no ano de 2008, sendo que, 69,6% das biofábricas que produziam mudas de bananeira por micropropagação também multiplicavam outras culturas, e apenas 30,4% faziam micropropagação somente dessa espécie (CARVALHO et al., 2012).

Os protocolos seguidos pelas biofábricas utilizam técnicas de micropropagação convencional (com reduzido risco de perda por contaminação, porém baixa produtividade) e/ou biorreatores de imersão temporária – BIT, com maior produtividade, porém riscos de perda por contaminação e possibilidades de variação somaclonal. Mesmo assim, apesar do aumento do número de biofábricas dedicadas a micropropagação de mudas de bananeira nos últimos anos, a produção atinge apenas 36% da demanda (DEBIASI, 2010).

Apesar dos protocolos para micropropagação de bananeira serem bem conhecidos, as biofábricas procuram manter sigilo em suas especificações, visando segredo industrial de seus aprimoramentos constantes, buscando nisto um diferencial de mercado. De acordo com Sá e Braga (2002) para o protocolo utilizado pela biofábrica da Universidade Federal de Uberlândia os explantes são estabelecido em meio de cultura, durante 30 dias. Do estabelecimento ao 5º subcultivo de

multiplicação, utiliza-se o meio MS suplementado com 5 mg.L⁻¹ de BAP e 30 g/L de sacarose, gelificado com 8 g.L⁻¹ de ágar. No enraizamento, utiliza-se um meio com 50% dos sais minerais do MS mais 15 g.L⁻¹ de sacarose e 8 g.L⁻¹ de ágar, sem BAP. Pereira & Boliani (2013), em estudos realizados nos laboratórios da UNESP obtiveram taxas de multiplicação que variaram de 1,3 a 3,8 brotos/explante para cultivar Thap Maeo (AAB).

Sing et al., (2011) relata, que no continente asiático, com protocolos de micropropagação bem definidos, suas biofábricas chegam a produzir, dependendo do grupo genômico e da variedade, até 10 mil mudas de bananeira provenientes de um único explante, em um prazo de 320 dias.

Segundo informações extraoficiais, no protocolo praticado pela biofábrica do laboratório de cultura de tecidos vegetais da Epagri em Santa Catarina, até meados de 2012 utilizava-se, com sucesso, o protocolo estabelecido e publicado por Zaffari et al (1994), onde os explantes eram estabelecidos por 60 dias em meio MS suplementado 1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de BAP; na fase de multiplicação em 5 subcultivos consecutivos de 30 dias, utilizando meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 30 g.L⁻¹ de sacarose, gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar. No enraizamento, utiliza-se um meio com 50% dos sais minerais do MS mais 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar. Utilizaremos em nosso trabalho este protocolo como testemunha representando os protocolos comumente utilizados por biofábricas.

Tendo em vista informações acima citadas, ajustes em protocolos de micropropagação de mudas de bananeira certamente serão bem vindos, pois a bananeira é uma das espécies mais micropropagadas no mundo e no Brasil esta tendência também é confirmada. Existem hoje no Brasil aproximadamente 20 a 30 laboratórios que possivelmente estejam produzindo algo em torno de 30 milhões de mudas micropropagadas de bananeira ao ano. Tendo o Brasil cerca de 520 mil hectares cultivados com esta espécie, podemos dizer que estejam sendo cultivados perto de 832 milhões de indivíduos. Sendo estimado um valor de 10% de reposição ou ampliação anual desta área, seriam necessários 83.200.000 de mudas de bananeira tendo que ser produzidas todos os anos. Desta forma observamos que ainda não é a maioria dos produtores que utilizam mudas micropropagadas para este fim de ampliação ou renovação de bananais, afinal o número apresentado representa certa de 36% desta demanda (DEBIASI, 2010).

3.5 Hormônios e reguladores de crescimento vegetais

O controle do crescimento e floração das plantas ocorre, principalmente, por meio da ação de hormônios vegetais como as auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e outros. Na micropropagação da bananeira, o regulador de crescimento mais utilizado é uma citocinina, o 6-Benzilaminopurina (BAP), aplicado na fase de multiplicação dos explantes (PEREIRA, 2011).

Muitos produtos sintéticos apresentam efeitos semelhantes aos dos hormônios vegetais, assim, denominados de reguladores vegetais. Dentro deste grupo de substâncias existem aqueles que podem inibir a síntese dos hormônios vegetais e, assim, regular o crescimento das plantas.

Segundo Rodrigues et al. (2004), o paclobutrazol, pertence a um grupo altamente ativo no controle do crescimento das plantas. Possui a capacidade de reduzir o crescimento vegetal através da inibição da oxidação microsomal do caureno, no qual é catalisada pela caureno oxidase do citocromo P-450 monoxigenase e a consequência direta será a inibição da biossíntese de giberelinas. Também atua na biossíntese do esterol, reduz a quantidade de ácido abscísico, etileno e ácido indol acético e aumenta a quantidade de citocininas (TOMILIN, 1995).

A gema vegetativa necessita estar competente. Segundo Taiz & Zeiger (2004), as células do meristema vegetativo adquirem novos destinos de desenvolvimento quando estão competentes, ou seja, capazes de responderem de maneira esperada quando recebem sinais apropriados. Por isto, a adição hormonal adequada, mesmo em concentrações corretas, não se torna garantia de desenvolvimento, variando entre espécies e envolvendo interações com vários outros fatores.

3.6 Carboidratos

Os açúcares solúveis são essenciais ao metabolismo, no desenvolvimento e em muitos processos fisiológicos (GIBSON, 2000). A glicose, frutose e sacarose possuem um papel essencial no desenvolvimento vegetal, sendo participantes de várias etapas do ciclo de vida do vegetal, desde a germinação, crescimento, reprodução, bem como de processos metabólicos, como a respiração. São, ainda, substratos para a síntese de carboidratos complexos como o amido e a celulose (SOUZA, 2006).

Além disso, os açúcares são moléculas construtoras para a biossíntese dos aminoácidos, lipídeos e outros componentes das plantas. São muito estudados como fontes importantes de energia, componentes estruturais e ainda como moléculas sinalizadoras e reguladoras da fisiologia e da expressão gênica (SMEEKENS, 2000).

A sacarose representa a principal forma de açúcar transportado nas plantas, dos locais de síntese (órgãos-fonte) para os de consumo do açúcar (órgãos-dreno).

Segundo Van't Hof (1968), os carboidratos possuem papel fundamental no processo de divisão celular no ápice radicular e em seu experimento com *Pisum sativum* L., as células de raízes excisadas não se dividiram até ser adicionada sacarose ao meio de cultura.

Apontam-se os açúcares não só como nutrientes, mas também como sinais fisiológicos que inibem ou promovem a expressão de genes envolvidos em processos importantes no vegetal, incluindo a regulação do ciclo celular.

Segundo Kraus et al. (2004), os carboidratos estão envolvidos no processo que antecede a divisão celular, possivelmente servindo como fonte de energia, pois quando cultivaram ápices radiculares isolados de *Catsetum frimbiatum in vitro*, durante 24 a 48 horas, observaram a presença de amiloplastos na região subapical e adjacências, sendo que após 72 horas estas organelas não estavam mais presentes.

Léon & Sheen (2003) mostraram que houve uma interação complexa entre açúcares e reguladores vegetais (etileno e ácido abscísico), quando mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Foram cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de açúcares exógenos, onde as raízes apresentaram um desenvolvimento diferenciado e que podem ter sido estimulados por um mesmo sinal em diferentes concentrações de carboidratos.

3.7 Amido

Grande parte do desenvolvimento das células vegetais envolve a degradação do amido, tendo como fonte os carboidratos presentes nas raízes, tubérculos, cotilédones e folhas (SMITH et al., 2005).

O amido é o composto de reserva em plantas superiores, servindo como fonte de energia para o desenvolvimento inicial da planta e tem como produto de sua hidrólise, a maltose (dissacarídeo) e a glicose (monossacarídeo) que estão presentes tanto nas frações de amilose (solúvel em água) como nas frações de amilopectina (insolúvel em água) (BADENHUIZEN, 1965).

Usciati et al. (1972), mostraram a participação do amido como também tendo um papel na indução do processo de divisão celular. Esses autores observaram acúmulo de amido nas células de gemas axilares de plântulas de *Cicer arietinum* nas primeiras quatro horas após a quebra da dominância apical com aplicação de citocinina, diferindo das plantas controles que não possuíam esse carboidrato de reserva. Os autores sugerem que o acúmulo de amido representaria um suprimento energético ao processo de divisão celular em tecidos com uma alta atividade meristemática.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios LAVEG (Laboratório de Anatomia Vegetal), do Centro de Ciências Biológicas e LFDGV (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal), do Centro de Ciências Agrárias, os dois últimos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, localizados na cidade de Florianópolis – SC.

4.1 Material vegetal

Perfilhos de bananeira do tipo “chifrinho”, provenientes de matrizes das cultivares Grande Naine (triploide de *Musa acuminata*, grupo AAA) e Prata Catarina (triploide de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, grupo AAB), coletadas na coleção da EPAGRI/EEI no período de 04 de Julho a 28 de Agosto de 2013, foram utilizados como material vegetal inicial.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no trabalho foram baseados no MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado dos reguladores de crescimento Paclobutrazol, BAP e ANA, pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, adição ou não de agente geleificante Agar (Himedia®), e esterilizados a 121°C com 1,3 atm de pressão por 20 minutos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Meios de cultura e seus respectivos códigos, uso em fases do cultivo *in vitro* e composição, tendo como base MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g.L⁻¹ de sacarose e com pH 5,8.

Código	Fases do cultivo <i>in vitro</i>	Composição
MEC1	Estabelecimento de Cultura	MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA e 0,7% de ágar
MEC2	Estabelecimento de Cultura	MS com 50% dos sais da formulação e 0,7% de ágar
MEC3	Estabelecimento de Cultura	MS com 1mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol e 0,7% de ágar
MEC4	Estabelecimento de Cultura	MS com 2mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol e 0,7% de ágar
MM1	Multiplicação	MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP e 0,7% de ágar
MM2	Multiplicação	MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP, 0,25mg.L ⁻¹ de ANA e 0,7% de ágar
MM3	Multiplicação	MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP (liquido)
ME1	Enraizamento	MS com 50% dos sais da formulação e 0,7% de ágar

MEC – Meio de Estabelecimento de Cultura; MM – Meio de Multiplicação;
ME – Meio de Enraizamento.

4.3 Fase de estabelecimento de cultura (introdução *in vitro*)

Mudas de bananeira do tipo “chifrinho” das cultivares Grande Naine e Prata Catarina foram extraídas com auxílio de pá (Figura 2–A) e ainda a campo, foram dissecadas e retirado os excessos de rizoma e pseudocaule, com auxílio de um facão (Figura 2–B). Foram encaminhadas em conjunto, separadas por cultivar (Figura 2–C), para casa de vegetação, lavadas com água corrente para retirar o excesso de solo e na sequência, sofreram redução do rizoma e retirada das bainhas foliares mais externas, resultando em explantes de 10 ± 2 cm de altura por 5 ± 1 cm de largura, contendo gema apical centralizada (Figura 2–D).



Figura 2 –Planta matriz de *Musa sp.* cultivar Grande Naine a campo. A – coleta de perfilhos de bananeira do tipo “chifrinho”; B – dissecação a campo do material vegetal coletado; C – material vegetal dissecado pronto para envio ao telado; D – dissecação.

Para o processo de desinfestação os explantes foram submetidos a pré-assepsia composta por solução de NaOCl a 0,5% por 16 horas. Após o tempo de imersão o material vegetal foi dissecado com bisturi, resultando em explantes equivalentes a 6 ± 1 cm de altura por 3 ± 1 cm, em cada lado, os quais sofreram uma segunda pré-assepsia em solução de NaOCl a 1%, por 60 minutos. Em seguida, os explantes foram lavados por três vezes em água destilada estéril (previamente esterilizada em autoclave a 121°C e 1,2 atm por 1 hora).

Na Câmara de fluxo laminar foi efetuado o tratamento de assepsia nos explantes utilizando Etanol a 70% por 5 minutos seguido de NaOCl a 1% por 30 minutos e três lavagens consecutivas em água destilada estéril (Figura 3-A).

Após a assepsia, os explantes foram novamente dissecados para a redução de tamanho, permanecendo com valores entre 1,2 a 1,5 cm de altura e 0,8 a 1,0 cm em cada lado (Figura 3-B e Figura 3C), e em seguida colocados em frasco de vidro (100 mL) contendo 15 mL de

meio de cultura MS (Murashige & Skoog (1962), com 30 g.L⁻¹ de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar, pH 5,8 ajustado antes da esterilização, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA (Figura 3-D).



Figura 3 -Etapas da micropropagação de Musa sp. cultivar Prata Catarina na fase de estabelecimento de cultura. A – assepsia de material vegetal, com explantes imersos em solução de NaOCl a 1%, por 30 minutos ; B – padrão de explantes dissecados e prontos para inoculação no meio de cultura; C - explante dissecado à medidas de 0,8 cm de base por 1,5 cm de altura; D – explante inoculado *in vitro* em meio MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de BAP.

Os materiais vegetais *in vitro* dos tratamentos TGN (tratamento da cultivar Grande Naine) e TCAT (tratamento da cultivar Prata Catarina) foram mantidos em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C e na ausência de luz, até o décimo dia com objetivo de diminuir índice de oxidação e após em fotoperíodo de 16 horas de luz, lâmpada fluorescente, a uma intensidade luminosa de 10 W.m⁻². Após 60 dias *in vitro*, amostras que necrosaram, morreram ou contaminaram foram excluídas do experimento. O restante foi dividido em 5 tratamentos por cultivar, tendo TEC1 como testemunha, ou seja, o mesmo tratamento

utilizado em biofábricas. Os tratamentos foram denominados de acordo com Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos de cultivar e da fase de estabelecimento de cultura, com seus respectivos tempos de exposição *in vitro* e meios de culturas utilizados.

Fase de Estabelecimento Cultura		
Cultivar	Tratamentos	Tempo de exposição e meio de cultura utilizado
TGN	TEC1 - testemunha	60 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA
	TEC2	90 dias - 90 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA
	TEC3	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 50% dos sais da formulação
	TEC4	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol
	TEC5	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 2mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol
TCAT	TEC1 - testemunha	60 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA
	TEC2	90 dias - 90 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA
	TEC3	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 50% dos sais da formulação
	TEC4	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol
	TEC5	90 dias - 60 dias em MS com 1mg.L ⁻¹ de BAP, 1mg.L ⁻¹ de ANA 30 dias em MS com 2mg.L ⁻¹ de Paclobutrazol

TGN - Tratamento do Cultivar Grande Naine); TCAT - Tratamento do Cultivar Prata Catarina); TEC – Tratamento de Estabelecimento de Cultura; MS – Murashige & Skoog..

No processo de divisão das unidades experimentais em seus respectivos tratamentos, aos 60 dias de subcultivo, em meio MEC1, como forma de garantir a homogeneidade amostral em cada tratamento, foram obtidas as medidas (de altura e tamanho da base), sendo calculado o volume de cada unidade experimental (material vegetal *in vitro*) na unidade de mm³ e efetuada as análises estatísticas.

Análises revelaram que tanto o cultivar Grande Naine (Figura 4A) quanto o cultivar Prata Catarina (Figura 4B), não houve diferenças significativas entre os volumes médios obtidos, independente do

tratamento. Tal resultado, indicando similaridade entre volumes médios, confirmou que houve homogeneidade na separação das amostras nos tratamentos propostos, no momento da separação das unidades amostrais (tratamentos e repetições de tratamentos), conforme confirmado através das análises de variância ANOVA, nos anexos, Tabelas 15 e 16.

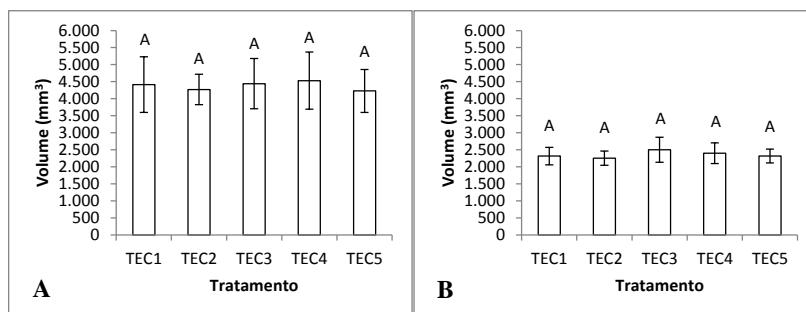


Figura 4 - Volume médio de explantes (material vegetal), unidades experimentais in vitro, obtidos aos 60 dias de cultivo, na fase de estabelecimento de cultura. Em A - cultivar Grande Naine; em B - cultivar Prata Catarina. Barras verticais indicam intervalo de confiança (IC).

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Ao final da fase de estabelecimento de cultura, foram avaliados: percentuais de oxidação, dado por 0%= não oxidado; 50%= metade do material oxidado e 100%= material totalmente oxidado (Figura 5) e medidas (altura e área da base), sendo também calculado o volume de cada material vegetal, dados em mm³. Além do registro através de fotografias de cada unidade experimental.

Para avaliação de oxidação considerou-se a área de base do explante, excluindo da análise a parte aérea (região foliar).

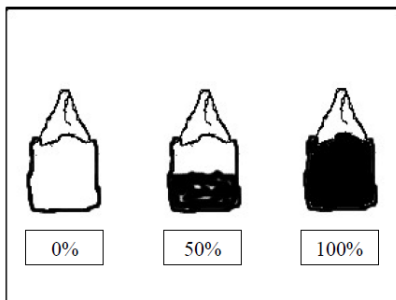


Figura 5 - Representação de níveis percentuais de oxidação em material vegetal in vitro de *Musa* sp. 0% – não oxidado; 50% - metade do material oxidado; 100% - material totalmente oxidado.

4.3.1 Plano amostral para análises morfoanatômicas e bioquímicas

O plano amostral para efetuação de análises morfoanatômicas e bioquímicas foi composto de 8 amostras aleatórias de explantes em cada coleta. Foram coletadas, para cada cultivar, amostras em T0 (tempo zero), antes da inoculação no meio de cultura MEC1, representando todos os tratamentos; após 60 dias em meio MEC1, representando todos os tratamentos; após 90 dias nos tratamentos TEC2, TEC3, TEC4, TEC5, de cada cultivar.

4.3.2 Análise estrutural em microscopia

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série etílica gradual, sendo conservadas em etanol 70% (RUZIN, 1999).

4.3.2.1 Quantidade de folhas

As amostras foram seccionadas transversalmente na região caulinar (Figura 6A) mantendo-se a espessura em torno de 0,5 cm, para inclusão em parafina as amostras (previamente fixadas e conservadas em etanol 70%) foram totalmente desidratadas em série etílica crescentes: 80, 90, 96, 100 (2 vezes) – cerca de ½ h em cada álcool. Após, foram imersas por 30 minutos em Xilol por duas vezes (totalizando 1 hora). Em estufa mantida a 58°C as amostras foram

imersas em solução de xilol/parafina (1:1) por aproximadamente 14 horas, em seguida em parafina por mais 3 horas (duas vezes, totalizando 6 horas). Retirou-se da estufa, emblocando imediatamente em parafina.

Secções transversais de 25 μ m foram obtidas usando micrótomo de rotação Leica - RM 2125 RT, onde as secções formaram “fitas” e foram distendidas em lâminas (6 unidades por lâmina) com algumas gotas de adesivo de Bissing (BISSING, 1974), mantidas por 1-2h a temperatura de 42 ± 2 °C (Figura 6B, 6C e 6D).

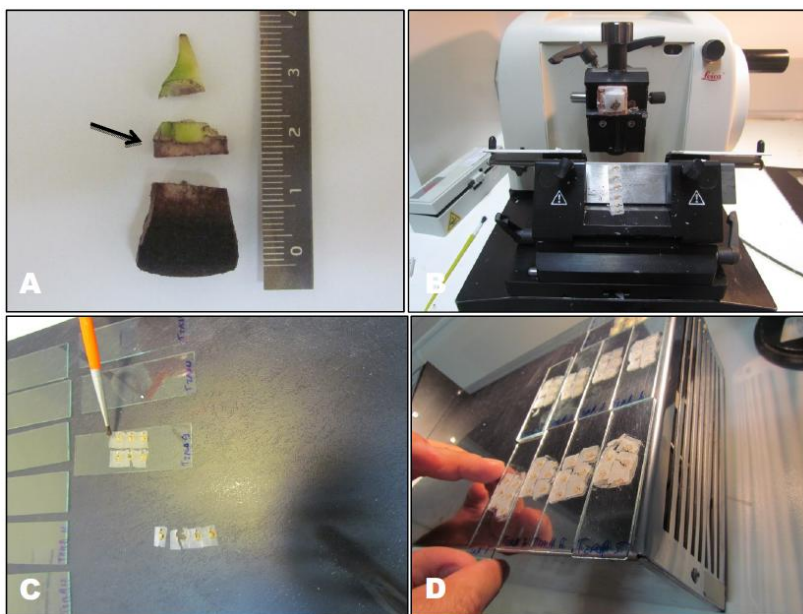


Figura 6 - Procedimentos para obtenção de lâminas com secções transversais em amostras explante de *Musa* cv. Grande Naine, coletadas na fase de estabelecimento de cultura. A – redução do tamanho do explante para região de interesse, marcado com seta preta (região de surgimento de folhas e maior probabilidade de organização celular, gemas); B – Secções transversais de 25 μ m sendo obtidas em micrótomo de rotação Leica - RM 2125 RT; C - formação de “fitas”, distendidas em lâminas (6 secções por lâmina); D – Secagem por 1-2h a temperatura de 42 ± 2 °C, em chapa de aquecimento.

As secções e as lâminas foram organizadas de forma sequencial (da primeira a ultima secção).

As contagens de folhas foram obtidas através de visualização sequencial das secções, utilizando Microscópio estereoscópico Leica M165 C. As imagens assim obtidas foram expostas em ordem sequencial (da secção superior para a secção inferior), em uma prancha de imagens, como o objetivo de facilitar a contagem e possibilitar a rastreabilidade das folhas.

A contagem da quantidade de folhas foi dada através do acompanhamento sequencial das imagens, identificando existência e posição das folhas (da secção superior) até seus primórdios (secção inferior), conforme especificado em Figura 7.

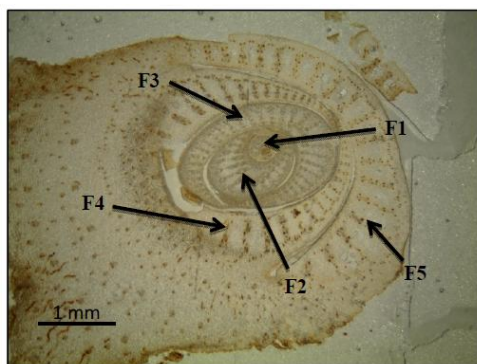


Figura 7 - Secção transversal de 25 µm do pseudocaule do cultivar de bananeira Prata Catarina, tratamento TEC3, contendo 5 folhas após 90 dias de cultivo in vitro. Sequencia de contagem de folhas: F1 – folha 1, F2 – folha 2, F3 – folha 3, F4 – folha 4, F5 – folha 5. Imagem obtida em Lupa Leica com aumento de 20 x.

4.3.3 Extração e determinação de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado usando o método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Amostras contendo 1 g de matéria fresca de cada tratamento foram maceradas em gral, com pistilo de porcelana, em nitrogênio líquido (-196°C). O material macerado foi transferido para tubos do tipo falcon, onde foram adicionados 2 ml de etanol 80% (gelado e preparado na hora) e em seguida a extração por fervura, durante 5 minutos. Os extratos foram centrifugados à 3.000 rpm por 10 minutos.

Este processo foi realizado 3 vezes, seguindo o método proposto por McCready et al. (1950). Obteve-se o sobrenadante, correspondente

a fração de açúcares solúvel, cujo volume final foi ajustado com etanol 80% (gelado e preparado na hora). O resíduo da extração alcoólica (precipitado) foi utilizado para posterior quantificação do amido, através do método colorimétrico de McCready et al. (1950).

Utilizando o sobrenadante foi realizada uma quantificação de carboidratos totais através da dosagem colorimétrica utilizando-se o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Em tubos de ensaio de 10 mL, foram pipetados 50 µL de extrato e adicionados 450 µL de água destilada, 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (96%). A absorbância foi medida em 490 nm. O teor de carboidratos totais foi estimado a partir de uma curva padrão pré-determinada com base no carboidrato padrão (glucose). Todas as dosagens foram realizadas simultaneamente, em triplicata, e os resultados expressos como a média dos valores obtidos, em miligramas por gramas de amostra ($\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$).

4.3.4 Extração e determinação do conteúdo de amido

Ao precipitado resultante da extração dos carboidratos solúveis, foram adicionados 2 mL de água destilada gelada (4°C) e 2,6 mL de ácido perclórico (52%), sendo mantido em agitação com bastão por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 4 mL de água destilada gelada e a solução foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi colocado em uma provetas e, ao resíduo, foram adicionados 1 mL de água destilada gelada (4°C) e 1,3 mL de ácido perclórico (52%), sendo novamente mantido em agitação, com bastão, por 15 minutos. A solução foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram juntados na proveta (100 mL), para unir as frações de amido. A solução foi homogeneizada e filtrada em lã de vidro. O volume foi ajustado para 20 mL com água destilada. Deste volume foram retirados 50 µL do extrato e adicionados 450 µL de água destilada, 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (96%). A partir deste extrato foram estimadas as concentrações de amido através do método de fenol sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O ácido perclórico rompe as ligações existentes na molécula de amido formando açúcares solúveis. A absorbância foi medida a 490 nm. O teor de amido foi estimado a partir de uma curva padrão determinada com base no carboidrato padrão glucose, e todas as dosagens foram realizadas simultaneamente, em triplicata.

4.4 Fase de multiplicação

Após fase de estabelecimento de cultura, cada TEC subdividiu-se 3 Tratamentos de Multiplicação (TM), com 5 repetições, totalizando 15 tratamentos por cultivar (STEC x 3 TM).

A fase de multiplicação, que foi composta de 5 subcultivos em intervalo de 30 dias cada.

No primeiro subcultivo, efetuou-se a raspagem “leve” com o bisturi nas laterais do explante para redução da oxidação (Figura 8A) e quebra de dominância apical com uso do bisturi, através da efetuação de dois cortes parciais longitudinais, em forma de “x”, no explante, iniciando do topo para a base, sem a separação física do material (Figura 8B).

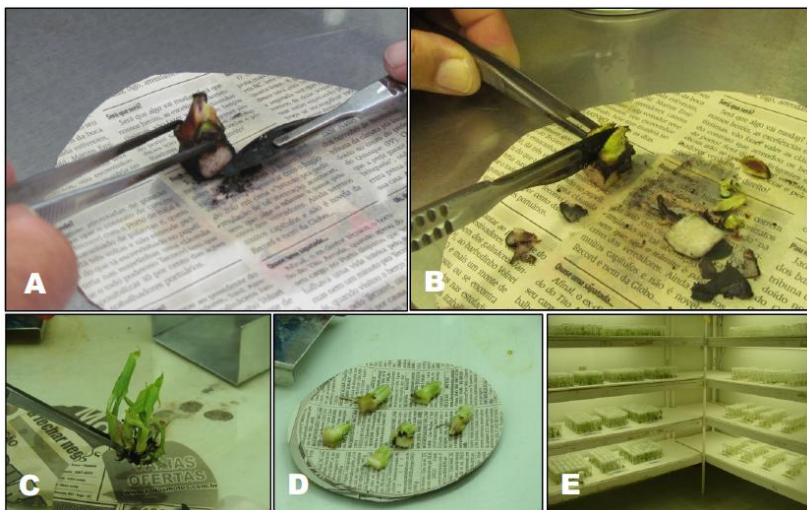


Figura 8 - Etapas da micropropagação de *Musa* sp, cultivar Grande Naine na fase de multiplicação. A – raspagem com bisturi nas laterais do explante para redução da oxidação; B - quebra de dominância apical com corte longitudinal em “X”, sem a divisão do explante; C – exemplo de brotações resultantes de uma unidade experimental; D - brotações excisadas e prontas para inoculação no próximo subcultivo; E - tratamentos (material *in vitro*) armazenados em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados.

Nos subcultivos seguintes as brotações formadas foram excisadas utilizando o bisturi, eliminando-se a parte aérea além dos 2 cm de altura e quebrando a dominância apical, nos brotos maiores que 1 cm, com

apenas um corte parcial longitudinal do topo para a base sem divisão do material (Figura 8C e 8D).

As brotações foram inoculadas nos respectivos meios de cultura de cada tratamento correspondente. O material vegetal *in vitro* foi mantido em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C em fotoperíodo de 16 horas de luz, lâmpada fluorescente branca, a uma intensidade luminosa de 10 W.m^{-2} (Figura 8E).

Para todos os tratamentos, em cada subcultivo foi avaliado, número de brotações formadas por explante. As avaliações foram efetuadas em todas as unidades experimentais.

4.5 Fase de enraizamento

Ao final do quinto subcultivo da fase de multiplicação, em cada unidade experimental de todos os tratamentos, as brotações formadas foram excisadas e individualizadas, utilizando bisturi, e transferidas para frascos de vidro (200 mL) contendo 25 mL de meio de enraizamento ME1, composto de meio de cultura MS (Murashige & Skoog (1962), com 50% dos sais da formulação e acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar, pH 5,8 ajustado antes da esterilização a 121°C com 1,3 atm de pressão por 20 minutos.

As unidades experimentais nesta fase foram compostas de seis brotações por frasco e o material vegetal *in vitro* foi mantido em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C em fotoperíodo de 16 horas de luz, promovido com lâmpada fluorescente, a uma intensidade luminosa de 10 W.m^{-2} , por 45 dias.

Ao final da fase de enraizamento (45 dias), as mudas foram quantificadas por tratamento em unidades e foram calculados, percentuais de rendimento.

4.6 Aclimatização

A cada tratamento proveniente da fase de enraizamento o material vegetal foi retirado dos frascos, cuidadosamente e feito lavagem em água corrente para eliminação do meio de cultura ainda aderido nas raízes e base das brotações. Após limpeza foi feita seleção das plantas, separando as plantas pequenas (menores de 2 cm de altura) das demais, para facilitar o plantio em bandejas e manter homogeneidade.

As mudas foram plantadas em tubetes, contendo substrato e distribuídas em mesas em telado protegido.

Na preparação do substrato, utilizou-se como medida, para alguns componentes, o volume, utilizando-se de baldes com capacidade de 18 Litros para facilitar o manuseio de maiores volumes à campo. O substrato utilizado foi composto de:

- 4 latas (capacidade de 18 L) de casca de arroz carbonizada
- ½ lata (capacidade de 18 L) de esterco (cama de aviário)
- 90 g de substrato humin NPK 14/ 16/ 18
- 100 g de calcário

Misturado sob agitação em betoneira por 15 minutos.

Nesta fase, após o plantio em substrato, as plântulas foram mantidas em elevada umidade relativa do ar, no viveiro, promovidas com fechamento das bancadas de aclimatização com plástico transparente (câmara úmida) e mantidas por 210 dias.

Ao final da fase de aclimatização (210 dias), as mudas foram quantificadas por tratamento em unidades e foram calculados, percentuais de rendimento.

4.7 Delineamento experimental e Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no trabalho foi inteiramente casualizado e aplicado a dois cultivares individualmente (Grande Naine e Prata Catarina).

Na fase de estabelecimento de cultura, 5 tratamentos por cultivar e 15 repetições por tratamento.

Na fase de multiplicação em parcelas subdivididas 5 parcelas x 3 subparcelas (5 tratamentos de estabelecimento de cultura x 3 meios de multiplicação) com 5 repetições. Resultando em 15 tratamentos por cultivar.

A unidade experimental consistiu de um frasco contendo uma gema/ frasco e as variáveis analisadas foram: altura, volume, percentuais de oxidação, teores de carboidratos totais, teores de amido, número de folhas, taxa de multiplicação e percentual de rendimento na fase de enraizamento.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% (Ferreira, 2003), utilizando o software Assistat 7.7 para análises estatísticas e os softwares Excel 2010, para elaboração de gráficos.

4.8 Condução do experimento

A Figura 9 apresenta o fluxograma das etapas do experimento e tempo de exposição aos meios de cultura nas fases do cultivo; fase de estabelecimento de cultura, fase de multiplicação, fase de enraizamento e fase de aclimatização. Ambos para os tratamentos do cultivar Grande Naine (TGN) e do cultivar Prata Catarina (TCAT).

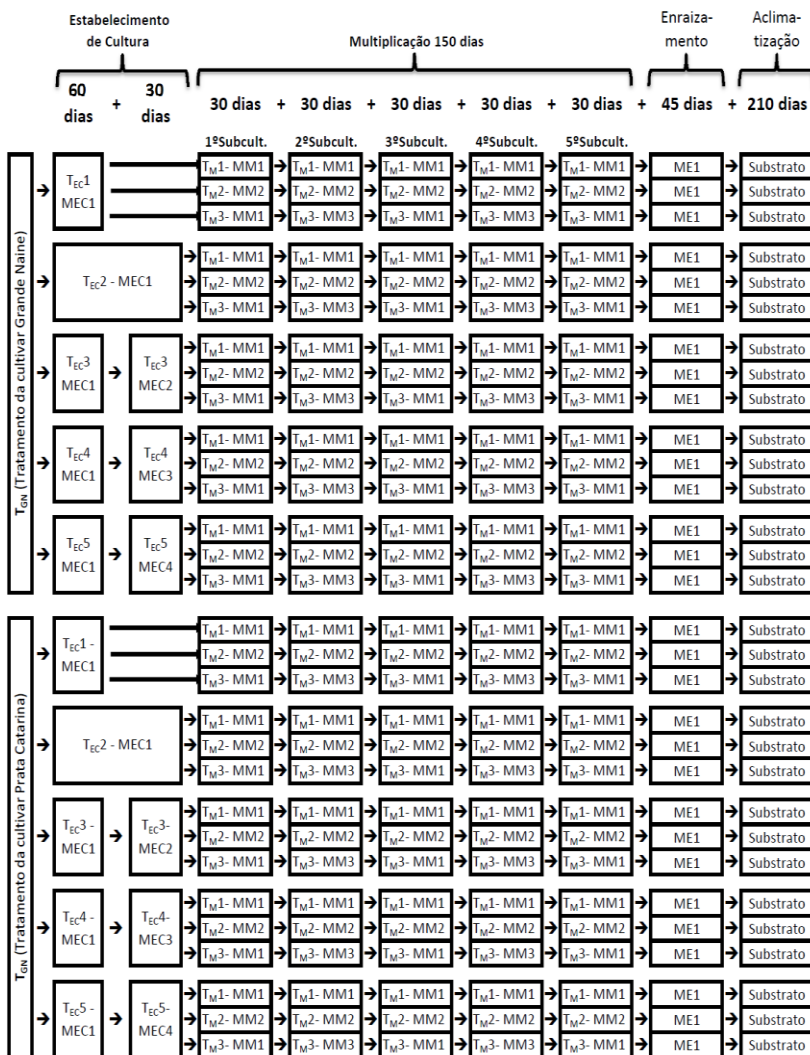


Figura 9 - Fluxograma geral das etapas do experimento, contendo fases e tempos de cultivo, tratamentos, subcultivos e meios de cultura ou substrato utilizado.

TEC – Tratamento de Estabelecimento de Cultura; TM – Tratamento de Multiplicação; MEC – Meio de Estabelecimento de Cultura; MM – Meio de Multiplicação; ME – Meio de Enraizamento.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase de estabelecimento de cultura *in vitro*

5.1.1 Oxidação

Após término da fase de estabelecimento de cultura, os percentuais de oxidação dos materiais vegetais *in vitro*, de *Musa sp.*, cultivares Grande Naine e Prata Catarina, foram avaliados em relação a região basal dos explantes. Os mesmos apresentaram região apical com pouca oxidação e mantiveram sobrevivência, tal como representado na Figura 10.

Para cultivar Grande Naine, os tratamentos TEC1, TEC2, TEC3 e TEC4 não apresentaram diferenças significativas nos percentuais médios de oxidação pelo teste de Tukey e o tratamento TEC5 apresentou redução no percentual de oxidação, diferindo entre os valores médios obtidos dos outros tratamentos (Figura 11 A). Análises de variância ANOVA presentes em anexo, Tabela 17.

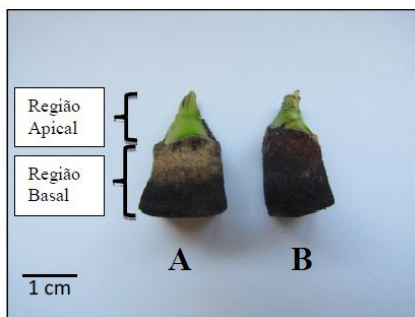


Figura 10 - Material vegetal *in vitro* de *Musa sp.* cultivar Grande Naine após finalização da fase de estabelecimento de cultura, exemplificando o aspecto das amostras com percentual de oxidação obtido no explante: A - 50% e B - 100%.

Para o cultivar Prata Catarina, verificou-se que não ocorreu diferença estatística significativa entre os valores médios obtidos, assim, o percentual médio de oxidação se manteve em 100% para todos os tratamentos (Figura 11 B). Análise de variância ANOVA no anexo, Tabela 18.

No tratamento TEC5 do cultivar Grande Naine, os resultados mostram que a oxidação dos explantes estão ligadas ao fator genético, sendo que o mesmo comportamento não foi observado no tratamento TEC5 do cultivar Prata Catarina. O presente resultado corrobora com Souza et al. (2000), que abordou, de uma forma geral, que a intensidade de oxidação pode ser atribuída às características intrínsecas do genótipo. Ainda, de acordo com Hirimburegama & Gamage (1997), cultivares portadores de genoma B (*Musa balbisiana*) mostraram maior escurecimento, oxidação, dos tecidos excisados ou cortados do que cultivares que apresentam apenas genoma A (*Musa acuminata*). O mesmo não ocorreu no presente trabalho para os tratamentos TE1, TEC2, TEC3 e TEC4, uma vez que os mesmos apresentaram percentuais de oxidação iguais para os genótipos AAA e AAB.

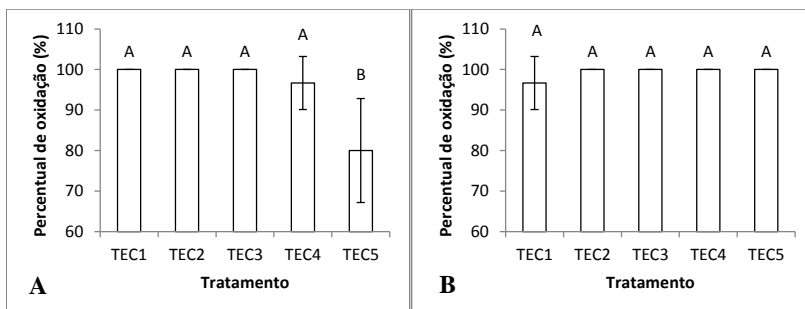


Figura 11 - Percentuais médios de oxidação em unidades experimentais in vitro, obtidos na finalização da fase de estabelecimento de cultura. Em A – cultivar Grande Naine; em B - cultivar Prata Catarina, Barras verticais indicam intervalos de confiança (IC).

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à redução do percentual médio de oxidação, no presente estudo, no tratamento TEC5, do cultivar Grande Naine, este pode estar relacionado a presença do regulador de crescimento paclobutrazol no meio de cultura. Nos tratamentos TEC4 e TEC5, materiais vegetais mantidos em cultivo por 60 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L^{-1} de ANA e 1 mg.L^{-1} de BAP foram transferidos para meios com concentrações de 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} , respectivamente. Aparentemente concentrações a partir de 2 mg.L^{-1} de paclobutrazol ao meio de cultura (TEC5) resulta na redução dos percentuais de oxidação, uma vez que TEC4 (1 mg.L^{-1} de paclobutrazol), não diferenciou

estatisticamente dos outros tratamentos. De acordo com Ribeiro et al. (2007), o paclobutrazol é um redutor de crescimento e bloqueia reações de oxidação na passagem de caureno para ácido caurenóico no caminho de síntese de substâncias giberelínicas.

Os tratamentos com paclobutrazol (TEC4 e TEC5), para o cultivar Prata Catarina, não apresentaram efeitos de redução no percentual de oxidação.

De uma forma geral sabe-se, através da literatura que a reação de oxidação dos explantes está relacionada com os tecidos excisados, tanto no processo de extração do explante, quanto na dissecação e ainda na fase de transferência, mudança de meios de cultura, fatos estes relatados por Santos et al. (2001). Segundo os mesmos autores, a oxidação é a reação do oxigênio com íons e este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes.

Há tempos, estudos visando à redução da oxidação na propagação *in vitro* de mudas de bananeira vêm sendo realizados. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) no processo de micropropagação da bananeira, a fase mais crítica é o estabelecimento dos ápices caulinares *in vitro*, em função da contaminação por fungos e bactérias e pela oxidação caracterizada pelo escurecimento do explante ou mesmo do meio de cultivo. Desde então, vários trabalhos foram realizados com o mesmo objetivo, tais como COSTA et al., 2006; CAMOLESI et al., 2007 e PEREIRA et al., 2011.

Costa et al. (2006), estudando bananeira do cultivar Grande Naine (AAA), durante a fase de multiplicação *in vitro*, observaram que a adição de 3 g.L⁻¹ de carvão ativado, reduziu de forma significativa o nível de oxidação.

Outros trabalhos, como Camolesi et al. (2007), apresentaram a redução da oxidação *in vitro* de bananeira Maçã, aplicando pré tratamento composto por 0,25 g.L⁻¹ de ácido cítrico e 0,75 g.L⁻¹ de citrato de potássio por 90 minutos, no material vegetal utilizado da referida variedade de bananeira.

Ainda Pereira et al. (2011) apresentaram resultados médios de 90% de oxidação nos explantes, porém sem ocasionar a perda dos mesmos. Eles atribuíram a utilização e concentração de hipoclorito de sódio, no processo de assepsia, como uma das principais causas da oxidação na fase de estabelecimento de cultura.

5.1.2 Altura e volume dos explantes

Para o cultivar Grande Naine (Tabela 4), os tratamentos TEC3, TEC4 e TEC5 induzam as maiores médias de altura com 32,3, 30,5 e 28,3 mm, respectivamente.

Os menores incrementos médios na altura dos explantes foram observados em culturas sob tratamento TEC1 (60 dias), e TEC2 (90 dias), cujos valores foram de 26 e 26,7 mm, respectivamente. Os tratamentos TEC1 e TEC2 resultaram em médias de altura sem diferença estatística significativa entre si, o mesmo acontecendo pra os tratamentos TEC4 e TEC5. Análises de variância (ANOVA) em anexo, Tabela 19.

Em relação a variável volume, para o cultivar Grande Naine, os tratamentos TEC3, TEC4, TEC5 e TEC2 foram capazes de induzir as maiores médias, com 6.348, 6.294, 4.975 e 4.671 mm³, respectivamente.

Os menores incrementos médios de volume foram obtidos nos tratamentos TEC1, testemunha, TEC2 e TEC5, cujos valores foram de 4.036, 4.671 e 4.975 mm³, respectivamente. Análises de variância (ANOVA) em anexo, Tabela 20.

Tabela 4 - Altura média e volume médio do explante *Musa sp.*, cultivar Grande Naine, *in vitro*, obtidos aos 60 dias de cultivo para o tratamento TEC1 e aos 90 dias de cultivo para os tratamentos TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5.

Tratamento	Altura (mm)	Volume (mm ³)
TEC1 – 60 dias (testemunha)	26,000 b	4036,714 b
TEC2 – 90 dias	26,667 b	4671,667 ab
TEC3 – 60 + 30 dias MS/2	32,333 a	6348,571 a
TEC4 – 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L ⁻¹	30,533 ab	6294,143 a
TEC5 – 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L ⁻¹	28,267 ab	4975,533 ab
CV(%)	15,60	40,52
DMS (Tukey)	4,59	5.970,02
Média geral	28,76	5.253,03

DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação; MS/2: meio Murashige & Skoog com metade dos sais da formulação; PBZ: paclobutrazol. As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para o cv. Prata Catarina, em se tratando de médias de altura, os tratamentos efetuados, mostraram resultados médios muito semelhantes, entre 23,27 e 26,13 mm (Tabela 5) e independente dos tratamentos não foi verificado diferença estatística significativa, conforme análise de variância (em anexo, Tabela 21).

Para as médias de volume, não houve diferença estatística entre as médias dos tratamentos TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5, porém o tratamento TEC1, testemunha, apresentou média de 2.341,3 mm³, sendo esta a menor média de volume entre os tratamentos, não diferindo apenas do tratamento TEC2 (Tabela 5). Análise de variância (ANOVA) em anexo, Tabelas 22.

Tabela 5 Altura média e volume médio do explante *Musa sp.*, cultivar Prata Catarina, *in vitro*, obtidos aos 60 dias de cultivo para o tratamento TEC1 e aos 90 dias de cultivo para os tratamentos TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5.

Tratamento	Altura (mm)	Volume (mm ³)
TEC1 – 60 dias (testemunha)	23,27 a	2.341,33 b
TEC2 – 90 dias	24,73 a	3.156,87 ab
TEC3 – 60 + 30 dias MS/2	26,13 a	3.481,07 a
TEC4 – 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L ⁻¹	25,67 a	3.750,73 a
TEC5 – 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L ⁻¹	25,80 a	3.671,60 a
CV(%)	11,84	32,12
DMS (Tukey)	3.043	1.078,12
Média geral	25,12	3.280,32

DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação; MS/2: meio Murashige & Skoog com metade dos sais da formulação; PBZ: paclobutrazol. As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O cultivar Grande Naine apresentou média geral de 28,76 mm para altura e 5.253,03 mm³ para volume, enquanto que o cultivar Prata Catarina apresentou média geral de 25,12 mm para altura e 3.280,32 mm³ para volume. Levando em consideração que para ambos os cultivares, no momento do estabelecimento da cultura, tomaram-se explantes com dimensões similares, observou-se que a cultivar Grande Naine apresentou melhores respostas, em termos de vigor, em relação aos tratamentos utilizados. (Tabela 4 e Tabela 5).

Comparando o desenvolvimento de mudas de genótipos de bananeira *in vitro*, Lessa (2007), observou que diferentes genótipos de *Musa sp.* apresentaram crescimento e desenvolvimento diferentes. O mesmo autor identificou que o cultivar Terrinha (AAB), apresenta crescimento inferior o cultivar Grande Naine (AAA) e atribui que a provável causa seja as diferentes respostas das cultivares, a sensibilidade ao estresse provocado nas fases iniciais de estabelecimento de cultura com a dissecação do explante.

O tratamento testemunha TEC1, em condições de cultivo *in vitro* por 60 dias em meio MM1, MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de BAP, esteve entre os tratamentos que apresentaram as menores médias de incremento em termos de volume dos materiais vegetais *in vitro* para ambos os cultivares. Não diferenciou estatisticamente, apenas dos tratamentos TEC2 e TEC5, para cultivar Grande Naine e TEC2 para cultivar Prata Catarina.

O tratamento TEC2 da c. Prata Catarina, onde os explantes permaneceram em condições de cultivo *in vitro* por 90 dias em meio MM1, apresentou médias de incrementos, em termos de volume, que não diferenciaram estatisticamente dos demais tratamentos.

O tratamento TEC3, onde os explantes permaneceram em condições de cultivo *in vitro* por 60 dias em meio MM1, e após este período foram transferidos para meio composto por MS com 50% dos sais e isento de reguladores de crescimento, sendo mantido por mais 30 dias sob condições de cultivo *in vitro*, apresentou-se entre os tratamentos que obtiveram os maiores incrementos médios de altura e volume, para o cultivar Grande Naine. O mesmo aconteceu para o incremento de volume do cultivar Prata Catarina. Os resultados para incremento médio de altura não apresentou diferença estatística para o cultivar Prata Catarina.

Os maiores incrementos no volume e altura dos explantes podem ser atribuído a sinalização hormonal. Sandoval – Yugar (2002), realizou experimento em variedade triploide (AAA) de *Musa sp.*, variando a concentração de BAP no meio de cultura. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de BAP favorecia a emissão de brotos, porém a altura dos materiais vegetais eram menores, sendo que a testemunha (concentração zero de BAP) foi a que apresentou as maiores médias de altura. O mesmo autor observou que em geral, o tamanho do broto é inversamente proporcional à concentração de BAP no meio de cultura. Essa resposta mostrou-se mais evidente em FHIA-01, híbrido do grupo genômico AAAB, subgrupo Prata.

Os tratamentos TEC4 e TEC5 onde após 60 dias as culturas foram transferidas para meio composto por MS, acrescido de 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} de Paclobutrazol, respectivamente, apresentaram resultados, para altura e volume, que para cultivar Grande Naine esteve entre os tratamentos que apresentaram os maiores incrementos. O mesmo comportamento foi obtido para volume do cultivar Prata Catarina, enquanto que para variável altura não houve diferença estatística nas médias obtidas.

Pode-se ainda inferir que os tratamentos TEC4 e TEC5 não diferenciaram estatisticamente entre si, para ambos os cultivares, mostrando que as concentrações de Paclobutrazol propostas nestes tratamentos não foram suficientes para diferencia-las em termos de incremento de altura e volume. O paclobutrazol é classificado como um inibidor da ent-caureno oxidase e atua na segunda etapa da síntese de giberelinas no citocromo P450 (RADEMACHER, 2000). O composto ativo alcança os meristemas subapicais da planta, inibindo a oxidação do caureno para ácido caurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico; o resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar fitotoxicidade, e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo (CAVATTE, 2007).

O paclobutrazol é um redutor de crescimento e bloqueia reações de oxidação na passagem de caureno para ácido caurenóico no caminho de síntese de substâncias giberelínicas e promove também uma série de alterações fisiológicas nas plantas (SALISBURY & ROSS, 1992). Com a inibição das giberelinas que promovem a estimulação do crescimento do caule, principalmente na região do entrenó de plantas jovens mediante a estimulação da divisão e alongação celular, esperava-se redução no crescimento, principalmente nos entrenós (crescimento apical) e que com isto, houvesse desbalanceamento hormonal, favorecendo o desenvolvimento basal, além de favorecimento no processo de maturação celular, pois as giberelinas também regulam a transição da fase juvenil à fase adulta e tal fato poderia acarretar na maior diferenciação de brotações.

Em relação aos tratamentos propostos TEC4 e TEC5 (contendo paclobutrazol), esta redução não foi observada na fase de estabelecimento de cultura, independente do cultivar, tendo em vista que estes tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação aos tratamentos que obtiveram aumento do vigor vegetativo. De acordo com evidências apresentadas acima, esperava-se, no presente estudo que os tratamentos contendo paclobutrazol apresentassem redução das médias de altura na fase de estabelecimento de cultura para

os cultivares em estudo em relação aos outros tratamentos propostos. Porém este efeito não foi observado na cv. Grande Naine que não apresentou diferença estatística significativa para o tratamento que obteve as maiores médias de altura (TEC3) e para os tratamentos que obtiveram as menores médias (TEC1 e TEC2), enquanto que para cv. Prata Catarina TEC4 e TEC5 não apresentaram diferença estatística significativa aos demais tratamentos propostos.

5.1.3 Análise bioquímica – Teor de Carboidratos Solúveis Totais e Teor de amido

5.1.3.1 Carboidratos Solúveis Totais

Com os resultados analíticos obtidos no presente trabalho foi possível observar que, apesar de ter sido acrescentada sacarose ao meio de cultura no qual os explantes foram cultivados, os teores endógenos desse açúcar assumiram comportamentos diferenciados, tanto nos tratamentos propostos, quanto nos cultivares analisados.

Os tratamentos “T0”, representando o explante antes da inoculação no meio de estabelecimento de cultura e, portanto sem a presença de açúcar exógeno, para cv. Grande Naine, obtiveram os menores teores de carboidratos totais.

No cultivar Grande Naine, os tratamentos TEC1 (mantido por 60 dias em estabelecimento de cultura em MEC1), TEC2 (mantido por 90 dias em estabelecimento de cultura em MEC1), TEC3 (90 dias em estabelecimento de cultura, sendo 60 dias em MEC1 e 30 dias em MEC2) e o TEC4 (90 dias em estabelecimento de cultura, sendo 60 dias em MEC1 e 30 dias em MEC3), não apresentaram diferenças estatísticas nas médias de teor de carboidratos (Figura 12 A). O tratamento TEC5 (90 dias em estabelecimento de cultura, sendo 60 dias em MEC1 e 30 dias em MEC4) diferenciou estatisticamente de TEC1, TEC2 e TEC3, apresentando os maiores teores de carboidratos solúveis totais, não diferenciando apenas de TEC4. Análise de variância (ANOVA) em anexo, Tabela 24.

Em relação o cultivar Prata Catarina os teores endógenos de açúcares também assumiram comportamentos diferenciados, com as menores médias de teor de carboidratos detectadas em “T0” e TEC1, seguida por TEC5 e TEC4. As médias de TEC2 e TEC4 não se diferenciaram estatisticamente e TEC3 apresentou os maiores teores de carboidratos (Figura 12 B). Análise de variância (ANOVA) em anexo, Tabela 26.

Definem-se os açúcares não só como nutrientes, mas também como sinais fisiológicos que inibem ou promovem a expressão de genes envolvidos em processos importantes no vegetal, incluindo a regulação do ciclo celular. Em um clássico estudo com ápices radiculares de plantas de ervilha, observou-se que o suprimento de sacarose ao meio de cultura promovia a transição das células da fase G1 para a fase S, ou da fase G2 para a fase M, promovendo as divisões celulares Van't Hof (1966).

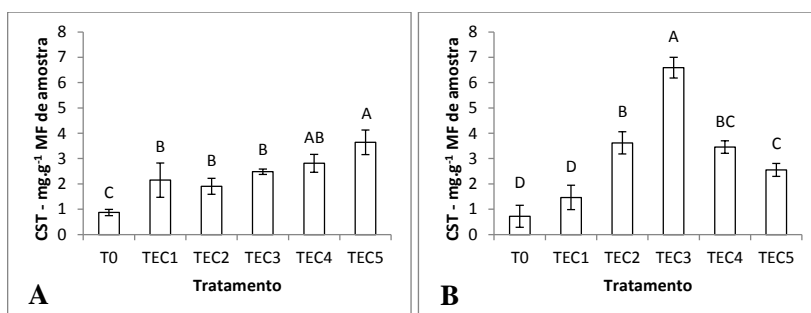


Figura 12 - Teores de Carboidratos Solúveis Totais (CST) em explantes de bananeira. A – cultivar Grande Naine; B - cultivar Prata Catarina; T0: antes de inoculação in vitro e TEC1 a TEC5: in vitro, na finalização do período de estabelecimento de cultura. (curva padrão: $y = 0,0152x + 0,0239$; $R = 0,9960$). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No experimento realizado, “T0” representou o teor de CST do explante extraído da planta mãe. Esperava-se que este apresentasse os menores teores de CST para ambas as cultivares, tendo em vista que a análise foi executada antes da inoculação do explante ao meio de cultura que apresenta em sua composição fonte de carbono. Esta afirmativa foi verdadeira para cultivar Grande Naine, porém na cultivar Prata Catarina “T0” não apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao tratamento testemunha T1 (60 dias), enquanto que comparada ao tratamento T2 (90dias), houve diferença significativa. Este comportamento pode estar evidenciando que para o genótipo AAB, cv Prata Catarina, o tempo de 60 dias não é suficiente para incremento do teor de CST.

Os açúcares além de serem considerados nutrientes são sinalizadores da expressão de certos genes reguladores da divisão e da diferenciação celular, influenciando positivamente ambos os processos (JANG et al., 1997).

Outro aspecto importante é a correlação entre as vias de transmissão de sinal de açúcares em plantas com as vias de sinalização de hormônios, controlando o crescimento e desenvolvimento. Foi observado que a glicose é uma molécula sinalizadora fundamental no desenvolvimento vegetal e na expressão gênica de síntese de hormônios (KOCH, 2004).

5.1.3.2 Amido

Para o cultivar Grande Naine os teores médios de amido apresentaram resultados abaixo dos obtidos nas análises de carboidratos solúveis totais. Os resultados mostraram maiores concentrações de amido por grama de MF em TEC5 e TEC1 e menores em “T0”, TEC2 e TEC4 (Figura 13A), ANOVA em anexo (Tabela 23).

Os resultados obtidos mostraram que para o cultivar Prata Catarina os maiores teores médios de amido foram observados nas culturas submetidas aos tratamentos TEC3 e TEC5 e os menores foram observadas em “T0”, TEC1 e TEC4 (Figura 13B). Análises de variância ANOVA em anexo, Tabela 25.

Em estudo realizado por Souza (2006), em explantes de segmento nodal decapitado de abacaxizeiro, foi observado um aumento de amido logo na 1ª hora, que se manteve até a 3ª hora. A partir desse momento, foi observada uma redução progressiva do amido até a 24ª hora. Desta forma, a autora constatou que houve um acúmulo transitório de amido nos explantes de segmento nodal decapitado, nas primeiras 3 horas. Nesses explantes, a presença inicial de amido foi considerada com sendo resultante da sacarose absorvida do meio de cultura, mas que logo poderia ser mobilizado, tanto para prover energia a partir da sua quebra em sacarose, quanto para sinalizar a retomada do ciclo celular.

Tal como demonstrado nas análises de teor de CST, em “T0” que representou o teor amido do explante extraído da planta mãe, esperava-se que este apresentasse os menores teores de amido para ambas as cultivares, tendo em vista que a análise foi executada antes da inoculação do explante ao meio de cultura que apresenta em sua composição fonte de carbono, porém os resultados obtidos não mostraram este comportamento. Para cultivar Grande Naine, “T0”, TEC2 e TEC4 não apresentaram diferença estatística significativa e para cultivar Prata Catarina “T0”, T1 e T4 também não apresentaram. Este comportamento pode estar evidenciando que além do fator “genótipo” o fator “tipo de tratamento”, também influenciou no incremento do teor amido.

Debiasi (2007), em estudo com bananeira cv. Grande Naine, sugere que o acúmulo de amido pode sinalizar potencialmente uma saída do estado de dominância apical e início de desenvolvimento de brotos laterais, já que pode haver conversão para formas de açúcares prontamente solúveis.

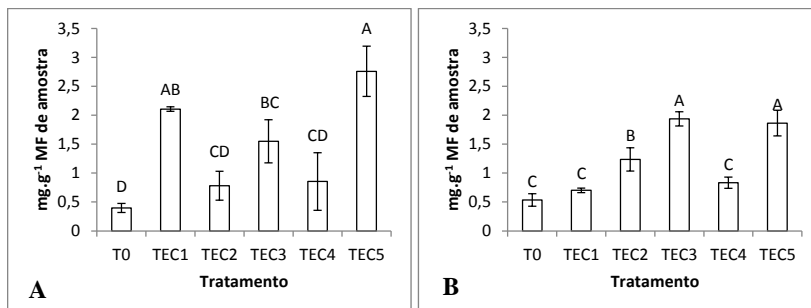


Figura 13 - Teores de Amido em explante de bananeira. A – cultivar Grande Naine; B - cultivar Prata Catarina; T0: antes de inoculação *in vitro* e TEC1 a TEC5: *in vitro*, na finalização do período de estabelecimento de cultura. (curva padrão: $y = 0,0152x + 0,0239$; $R = 0,9960$). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

5.1.4 Análise estrutural - Número de folhas

Para estas contagens, foi analisada a morfologia de secções transversais dispostas sequencialmente em pranchas, como mostrado através de algumas imagens extraídas na Figura 15. Na fase de estabelecimento de cultura para os cultivares Grande Naine e Prata Catarina os explantes no momento da inoculação ao meio de cultura (T0), continham uma gema apical e em média 4 folhas, Figura 14. Após 60 dias de cultivo, alguns dos tratamentos propostos apresentaram surgimento de novos primórdios foliares.

No cultivar Grande Naine, após fase de estabelecimento de cultura, identificou-se tratamentos com a presença de 6 folhas (TEC1 e TEC3), com 5 folhas (TEC2 e TEC4) e o tratamento TEC5 que manteve-se com 4 folhas em amostras do no material vegetal *in vitro*. Enquanto que o cultivar Prata Catarina apresentou o tratamento TEC4 com 6 folhas; TEC2, TEC3 e TEC5 com 5 folhas e o tratamento TEC1 manteve-se com 4 folhas em amostras do no material vegetal *in vitro* (Figura 14).

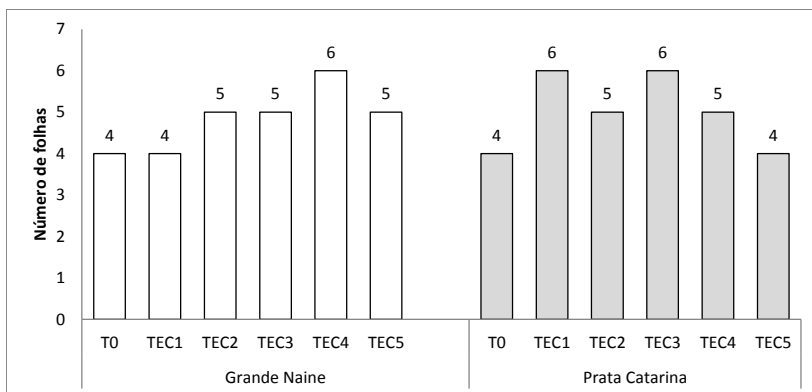


Figura 14 - Número médio de folhas em explante de *Musa* sp., cultivares Grande Naine e Prata Catarina. Antes da inoculação no meio de cultura (T0) e ao final da fase de estabelecimento de cultura (TEC1 a TEC5) com imagens extraídas de secções transversais de 25 μ m, expostas sequencialmente (do topo para base) em prancha de imagens.

O princípio de regenerar novas plantas a partir de um único propágulo se baseia na ativação do crescimento de gemas axilares presentes na inserção das folhas na base do rizoma, por meio de balanço hormonal (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2009).

Sendo que após a formação de cada folha, existe a formação da gema axilar de brotação, pode-se facilmente concluir que a bananeira tem tantas dessas gemas quantas forem as folhas geradas. Porém, os resultados obtidos ao final da fase de estabelecimento de cultura, para número de folhas por explante em cada tratamento proposto, não refletiu no número médio de brotações no primeiro subcultivo da fase de multiplicação (Tabela 6). Este comportamento provavelmente pode ser explicado pelo evento da dominância apical, que segundo Taiz & Zaiger (2004) e Souza (2006), o controle exercido pelo ápice caulinar sobre o crescimento das gemas axilares, ramos e folhas é influenciado, em diferentes graus, por fatores ambientais, genéticos e fisiológicos.

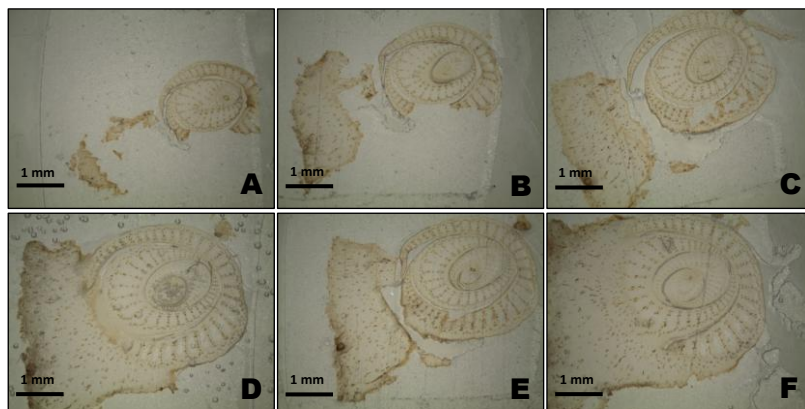


Figura 15. Secções transversais de 25 μm do cultivar Prata Catarina no tratamento TEC3 com 90 dias de cultivo, obtidas sequencialmente do ápice para base, de região de surgimento de primórdios foliares, próximo a gema apical.. Imagens extraídas de prancha de exposição sequencial composta de 50 fotos, sequência: A – foto 1; B – foto 11; C – foto 20; D – foto 29; E – foto 37; F – foto 49. Obtidas em microscópio estereoscópico com aumento de 20 vezes.

De acordo com Dantas (1988), na bananeira, os brotos *in natura* somente iniciam o desenvolvimento a partir do surgimento dos primórdios da 9^a à 11^a folha, estando sujeitos a uma forte dominância apical.

Tabela 6 - Número médio de folhas no final da fase de estabelecimento de cultura (60 dias para TEC1 e 90 dias para os demais tratamentos) e número médio de brotos obtidos ao final do primeiro subcultivo de 30 dias na fase de multiplicação, ambos dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina.

Tratamentos		Número de folhas	Número médio de brotações 1 ^o subcultivo
Cultivar Grande Naine	TEC1 – 60 dias (testemunha)	6	2,07
	TEC2 – 90 dias	5	3,73
	TEC3 – 60 + 30 dias MS/2	6	3,13
	TEC4 – 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L ⁻¹	5	3,40
	TEC5 – 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L ⁻¹	4	3,46
Cultivar Prata Catarina	TEC1 – 60 dias (testemunha)	4	2,00
	TEC2 – 90 dias	5	4,13
	TEC3 – 60 + 30 dias MS/2	5	3,73
	TEC4 – 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L ⁻¹	6	3,33
	TEC5 – 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L ⁻¹	5	2,93

5.2 Fase de Multiplicação

5.2.1 Taxa de multiplicação

5.2.1.1 Cultivar Grande Naine (AAA)

Tratamentos de Estabelecimento de Cultura (TEC)

Os resultados obtidos na fase de multiplicação, em relação à fase de estabelecimento de cultura, indicam que nos tratamentos propostos (Tabela 7), o tratamento TEC2 (90 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA), resultou na maior taxa de multiplicação, com média de 197,8 mudas por explante inicial, enquanto que a menor taxa de multiplicação foi dada no tratamento testemunha TEC1 (60 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA), com 47,1 mudas por explante inicial estabelecido. A Taxa de multiplicação intermediária foi obtida nos tratamentos TEC3 (90 dias, com 60 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA e 30 dias em meio MS com 50% dos sais da formulação), TEC4 (90 dias, com 60 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA e 30 dias em meio MS, adicionado de 1 mg.L⁻¹ de Paclobutrazol) e TEC5 (90 dias, com 60 dias em meio MS, acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA e 30 dias em meio MS, adicionado de 2 mg.L⁻¹ de Paclobutrazol), com 137,86, 81,53 e 121,46 mudas por explante inicial, respectivamente, porém ambas com taxa de multiplicação maiores que o tratamento testemunha (TEC1).

Tratamentos utilizando-se de Paclobutrazol (TEC4 e TEC5) induziram desempenho superior apenas ao TEC1, tratamento testemunha, porém não foram capazes de prover taxa de multiplicação maior que os tratamentos TEC2 e TEC3.

Quando comparados, TEC4 (com 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol) obteve médias de taxa de multiplicação inferiores a TEC5 (com 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol, não corroborando com Silva & Faria Júnior (2011) que identificou, em estudo com tomateiro, que com a utilização e o incremento na concentração de paclobutrazol, apesar de se tratar de uma dicotiledônea, reduziu significativamente o número de brotos e a massa de matéria seca da brotação lateral. Os mesmos autores identificaram que a utilização do regulador de crescimento paclobutrazol determinou decréscimos, em média, de 36, 48 e 56% no número de brotos laterais.

Tratamentos de multiplicação (TM)

Ao longo dos 5 subcultivos, em relação aos três tratamentos usados para a fase de multiplicação, ocorreu crescimento ascendente, de número de brotos por explante, do tipo exponencial para todos os tratamentos, tal como apresentado no gráfico de tendência comportamental, Figura 16.

O tratamento de multiplicação TM1, que utilizou o meio de cultura MS, acrescido de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, destacou-se entre os demais por apresentar as mais elevadas taxas de multiplicação (210 mudas por explante inicial). Segundo Ikram et al. (2007), o melhor desempenho do BAP em relação às outras citocininas, na indução da formação de brotações múltiplas em culturas de ápices caulinares, tem sido relatado para vários cultivares de bananeira. Os efeitos superiores dessa citocinina podem ser atribuídos à sua estabilidade nas culturas *in vitro*, tendo em vista não ser degradada com facilidade, persistindo, assim, no meio de cultura por mais tempo (RESMI et al., 2011).

O tratamento TM2, que constou de meio de cultura MS, acrescido de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, apresentou taxa de multiplicação de 73,16 brotações por explante inicial, enquanto que TM3 que utilizou o meio de cultura MS, acrescido de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, alterando o estado físico do meio de cultura (semissólido: com agente geleificante ágar e líquido: sem agente geleificante), 1º subcultivo – semissólido; 2º subcultivo – líquido; 3º subcultivo – semissólido; 4º subcultivo – líquido e 5º subcultivo - semissólido, apresentou taxa de multiplicação de 68 brotações por explante inicial (Tabela 7).

Pode-se inferir que TM2 e TM3 apresentaram taxas de multiplicação similares, 73 e 68 brotações por explante inicial estabelecido, mostrando potencial inferior em termos de geração de brotações quando comparados a TM1, que resultou em 210,08 brotações por explante inicial estabelecido. Silva et al. (2011), em estudo da taxa de multiplicação da planta medicinal segurelha (*Satureja montana*), identificou que aos 60 dias de cultivo, médias de 90 brotos por explante quando utilizado meio MS suplementado com BAP e médias de 17,69 brotos por explante quando ao meio contendo BAP foi adicionado ANA. Resultado este que corrobora com os resultados obtidos para o tratamento de multiplicação TM2.

O meio líquido intercalado ao semissólido, que foi utilizado no tratamento TM3, apresentou taxas de multiplicação menores que as taxas do tratamento TM1 (semissólido). Isto pode ser devido a necroses

no material vegetal, causadas por super-hidratação e falta de oxigenação para que o crescimento ocorra. Goel et al. (2007) registraram uma baixa taxa de multiplicação em *Rauwolfia serpentina*, em um meio líquido, que eles atribuem a asfixia de explantes, que resultaram da submersão ao meio. Segundo autores, isto significa que os meios de líquidos têm de ser agitados para fornecer oxigênio suficiente para os tecidos.

Interação entre os Tratamentos de estabelecimento de cultura (TEC) e os Tratamentos de Multiplicação (TM); TEC x TM

Para a cv. Grande Naine, após o quinto subcultivo da fase de multiplicação, com as médias obtidas de número de brotações por explante inicial inoculado, obteve-se interação significativa ao nível de 1% de probabilidade de erro na interação dos 5 tratamentos de estabelecimento de cultura com os 3 tratamentos de multiplicação (ANOVA, em anexo, Tabela 27).

Como consta na Tabela 7, verificou-se que TM1, resultou nas maiores taxas de multiplicação nas unidades experimentais provenientes dos tratamentos de estabelecimento de cultura TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5. As médias de taxa de multiplicação para TM1 não diferiu estatisticamente das médias de TM2 apenas no tratamento de estabelecimento de cultura TEC1 (testemunha).

TM1 foi o tratamento de multiplicação mais eficiente na geração de brotos/ explante inicial inoculado para *Musa sp.*, cv. Grande Naine, sendo que foi o que regenerou a maior quantidade de brotos. Mesmo TM1, sendo o tratamento de multiplicação mais eficiente na geração de brotações, quando utilizou unidades experimentais provenientes da fase de estabelecimento de cultura TEC1 (testemunha), apresentou médias de 70,2 brotos por explante inicial estabelecido, enquanto que quando utilizou unidades experimentais provenientes da fase de estabelecimento de cultura TEC2, apresentou médias de 356 brotos por explante inicial estabelecido. Estes valores significam que (TEC2 + TM1) apresenta médias cinco vezes maiores que (TEC1 + TM1).

O tratamento de multiplicação TM1 nas unidades experimentais provenientes da fase de estabelecimento de cultura TEC3, apesar de apresentar rendimentos menor que TEC2, também se mostrou positivo em relação ao tratamento testemunha (TEC1), com média de 250,8 brotos por explante inicial estabelecido, número este superior a 3,5 vezes aos resultados obtidos no tratamento testemunha e quando se utilizou tratamentos de multiplicação TM1 com as unidades experimentais provenientes da fase de estabelecimento de cultura TEC4

e TEC5, foram obtidas médias de 136,8 e 236,6 brotos por explantes, respectivamente. Médias estas, também superiores em 1,9 vezes em relação a TEC4 e 3,4 vezes em TEC5, em relação, quando comparadas a testemunha (TEC1).

Tabela 7 - Número médio de brotos por explante inicial estabelecido da cv. Grande Naine, após quinto subcultivo de multiplicação. Meios de estabelecimento de cultura: MEC1 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA; MEC2 – MS, com 50% dos sais da formulação; MEC3 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol; MEC4 – MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol. Tratamentos de multiplicação: TM1 – meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP; TM2 – meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA; TM3 - meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e meio MS líquido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP , intercalados do primeiro ao quinto subcultivo.

Tratamentos de Estabelecimento de Cultura	Tratamentos de multiplicação (nº de brotos por explante)			
	TM1	TM2	TM3	\bar{X}
60 dias - (60 dias MEC1) - Testemunha	70,2 dA	52,0 bA	19,0 dB	47,1
90 dias - (90 dias MEC1)	356,0 aA	121,2 aB	116,2 aB	197,8
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC2)	250,8 bA	112,0 aB	50,8 cC	137,9
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC3)	136,8 cA	40,0 bC	67,8 bcB	81,5
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC4)	236,6 bA	40,6 bC	87,2 bB	121,5
\bar{X}	210,08	73,16	68,2	117,16

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula) nas colunas e (maiúscula) nas linhas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Braga et al. (2001), em estudo com *Musa ssp* da cv Caipira (AAA), com os explantes que haviam permanecido por 30 dias na fase de estabelecimento de cultura e após 5 subcultivos consecutivos de 30 dias na fase de multiplicação, utilizando meio MS, acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP, obteve uma média de 70,9 brotos por explante inicial, introduzido *in vitro*.

Mendes et al. (1996) obtiveram 676 brotos/explante (variando de 143 a 1850) para a variedade Nanicao (AAA), após seis subcultivos, enquanto Oliveira & Silva (1997) obtiveram uma eficiência de 190 brotos/explante, após o mesmo período e utilizando a mesma variedade.

Taxas de multiplicação mais expressivas foram encontradas por Lima e Moraes (2006) para o cultivar Caipira (AAA), com 2.366 brotos/explante, utilizando na fase de multiplicação, MS acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP em 5 subcultivos de 30 dias cada.

5.2.1.2 Cultivar Prata Catarina (AAB)

Tratamentos de estabelecimento de cultura (TEC)

Os TEC's propostos apresentaram resultados similares em termos de brotos/rizoma, quando somados os resultados obtidos nos tratamentos de multiplicação. Mesmo assim podemos inferir que os tratamentos TEC2 e TEC4, apresentaram as maiores médias de brotos/ explante, 94,3 e 87,7 brotos/ explante, respectivamente e o tratamento de estabelecimento de cultura TEC5, obteve a menor média de geração de brotos por explante inicial estabelecido, com média de 42,5 brotos/ explante. Enquanto que TEC1 e TEC3 apresentaram resultados de geração de brotos intermediários aos demais tratamentos, com 74 e 78,6 brotos/explante inicial estabelecido (Tabela 8).

Quando comparados os tratamentos que utilizaram o regulador de crescimento paclobutrazol, TEC4 (com 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol) obteve médias de taxa de multiplicação inferiores a TEC5 (com 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol, não corroborando com Souza et al. (2010), que em experimento com *Musa sp.*, cultivar Prata (AAB) e cultivar Fhia (AAAB) verificou que acréscimos nas doses de paclobutrazol proporcionam redução exponencial no número de perfilhos emitidos para planta ao longo do ciclo produtivo.

Tratamentos de multiplicação (TM)

Os resultados obtidos para taxa de multiplicação, após quinto subcultivo, para o cultivar Prata Catarina, mostraram diferença significativa entre as médias dos tratamentos de multiplicação TM (Tabela 8), onde, tal como no tratamento do cultivar Grande Naine, o TM1 que utilizou o meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, destacou-se como o que apresentou as maiores médias, com 124,72 brotos/ explante inicial estabelecido, somando-se as médias obtidas nos tratamentos de estabelecimento de cultura.

A média das médias de número de brotos/explante para o tratamento de multiplicação TM2 foi de 18,44. Este resultado representa

a menor média de número de brotos entre os tratamentos de multiplicação aplicados.

O tratamento de multiplicação TM3 apresentou 83,1 brotos/explante inicial estabelecido, média abaixo das médias obtidas no tratamento TM1, confirmando que a utilização do meio de cultura semissólido em todos os subcultivos apresenta maiores taxas de multiplicação que o meio de cultura semissólido alternado com meio líquido nos subcultivos.

Interação entre os Tratamentos de estabelecimento de cultura (TEC) e os Tratamentos de Multiplicação (TM); TEC x TM

Na análise de dados em conjunto, buscando a interação entre tratamentos de estabelecimento de cultura e tratamentos de multiplicação, do cultivar Prata Catarina, verificou-se através da análise de variância (ANOVA) que houve significância estatística ao nível de 1% de probabilidade de erro (Tabela 28).

Os resultados para taxa média de multiplicação no quinto e ultimo subcultivo, do cultivar Prata Catarina, demonstraram que, tal como no tratamento do cultivar Grande Naine, o tratamento de multiplicação TM1, resultou nas maiores taxas de multiplicação nas unidades experimentais em interação com os tratamentos de estabelecimento de cultura TEC1, TEC2, TEC3, TEC4 e TEC5, com médias de 140, 132, 133, 141 e 77 brotos/explante inicial estabelecido, respectivamente. Não diferenciando apenas do tratamento de multiplicação TM3, em interação com o tratamento de estabelecimento TEC2 com 130,6 brotos/explante inicial estabelecido (Tabela 8).

Com estes resultados, tal como os obtido para o cultivar Grande Naine, o tratamento TM1 foi o mais eficiente na geração de brotos/explante inicial, sendo que foi o que regenerou a maior quantidade de brotos, enquanto TM2 e TM3, apesar de diferirem estatisticamente nas médias geradas na interação com os TEC's, apresentam médias de brotos/ explante inicial inferiores as médias obtidas em TM1.

Nos tratamentos de estabelecimento de cultura (TEC) na interação com os tratamentos de multiplicação, verificou-se que quando foi utilizado o tratamento de multiplicação TM1 (mais eficiente entre os tratamentos de multiplicação) as médias da interação com TEC1, TEC2, TEC3 e TEC4 não diferem estatisticamente, mostrando que os tratamentos de estabelecimento de cultura não surtiram efeitos na taxa de multiplicação. No entanto, quando interagiu com TEC5, diferiu estatisticamente e apresentou a menor média de brotos/ explante inicial.

No tratamento de multiplicação TM2 em interação com os tratamentos de estabelecimento de cultura, não houve diferença estatística entre as médias de brotos/ explante obtidas. TM3 em interação com os tratamentos de estabelecimento de cultura houve diferença estatística com destaque a com TEC2 que apresentou média de 130,6 brotos por explante. Médias estas, similares as melhores médias obtidas no experimento com o cultivar Prata Catarina, no TM1.

Tabela 8 Número médio de brotos por explante inicial estabelecido da cv. Prata Catarina, após quinto subcultivo de multiplicação. Meios de estabelecimento de cultura: MEC1 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA; MEC2 – MS, com 50% dos sais da formulação; MEC3 – MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de paclobutrazol; MEC4 – MS acrescido de 2 mg.L⁻¹ de paclobutrazol. Tratamentos de multiplicação: TM1 – meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP; TM2 – meio MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA; TM3 - meio MS semissólido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e meio MS líquido, acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP , intercalados do primeiro ao quinto subcultivo.

Tratamentos de Estabelecimento de Cultura	Tratamentos de multiplicação (nº de brotos por explante)			
	TM1	TM2	TM3	\bar{X}
60 dias - (60 dias MEC1) - Testemunha	140,0 aA	21,4 aC	60,6 cB	74,0
90 dias - (90 dias MEC1)	132,2 aA	20,0 aB	130,6 aA	94,3
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC2)	133,0 aA	24,2 aC	78,6 cB	78,6
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC3)	141,4 aA	14,4 aC	107,4 bB	87,7
90 dias - (60 dias MEC1 + 30 dias MEC4)	77,0 bA	12,2 aC	38,4 dB	42,5
\bar{X}	124,72	18,44	83,12	75,4

As médias seguidas pela mesma letra (minúscula) nas colunas e (maiúscula) nas linhas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em estudo realizado com a cultivar Thap Maeo (AAB), taxas de multiplicação mais expressivas foram encontradas por Lima e Moraes (2006) com 1.016 brotos/expalnte, utilizando na fase de multiplicação, MS acrescido de 5 mg.L⁻¹ de BAP em 5 subcultivos de 30 dias cada. Enquanto que Rios, et al., (2008) obtiveram uma média de 331,42 brotos/explante com o mesmo número de subcultivos, utilizando MS acrescido de 7 mg.L⁻¹ de BAP.

5.2.1.3 Comparação entre os cultivares Grande Naine e Prata Catarina

Os resultados obtidos para número médio de brotos por explante, Tabela 9 e taxa de multiplicação Tabela 10, nos cultivares Grande Naine e Prata Catarina, mostraram comportamento e respostas diferenciadas nos tratamentos provenientes da fase de estabelecimento de cultura e de multiplicação propostos, ao longo dos subcultivos.

No presente trabalho obteve-se número médio de 70 a 356 mudas por explantes, para a variedade do grupo Cavendish (genoma AAA), cv. Grande Naine e 77 a 141 mudas por explante, para a variedade do grupo Prata (genoma AAB), cv. Prata Catarina, ambas em cinco subcultivos sucessivos. Além destes dados, observou-se que somadas as médias de TM1 (tratamento da fase de multiplicação que obteve maiores médias de número de brotos/ explante para ambos os cultivares) o cultivar Grande Naine apresentou médias de 210,08 brotos por explante, enquanto que o cultivar Prata Catarina obteve 124,72 brotos por explante, ao final do quinto subcultivo corroborando com Resmi & Nair e Singh et al., (2011). Estes autores afirmam que em geral, os genótipos diplóides apresentam taxas de multiplicação superiores aos cultivares comerciais e, entre estas, o número de mudas obtidas durante subcultivos sucessivos é maior nas variedades do grupo Cavendish (genoma AAA), quando comparado com o das variedades do grupo Prata (genoma AAB e ABB).

Tabela 9 - Número médio de brotos/ explante ao longo de cinco subcultivos, em mudas de bananeira dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina, submetidas a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação.

Tratamento		1º Subcultivo			2º Subcultivo			3º Subcultivo			4º Subcultivo			5º Subcultivo		
		MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Grande Naine	TEC1	2,0	2,2	2,0	5,2	5,8	3,4	8,6	14,0	4,8	24,3	26,4	10,6	70,2	52,0	19,0
	TEC2	3,6	4,2	3,4	11,2	11,6	7,8	38,0	25,4	23,8	115,0	53,4	39,8	356,0	121,2	116,2
	TEC3	2,6	3,6	3,2	11,0	8,8	5,2	30,8	19,2	14,2	80,6	45,4	20,8	250,8	112,0	50,8
	TEC4	3,0	3,2	4,0	7,0	7,8	9,6	20,2	14,6	23,4	47,6	24,0	32,2	136,8	40,0	67,8
	TEC5	3,4	3,8	3,2	11,4	6,6	12,6	31,6	12,4	30,6	85,8	21,6	43,4	236,6	40,6	87,2
Prata Catarina	TEC1	2,0	2,0	2,0	10,6	5,6	6,8	26,6	9,8	18,0	67,8	16,4	30,0	140	21,4	60,6
	TEC2	4,4	3,6	4,4	12,6	7,6	12,6	26,6	12,2	27,8	55,4	17,6	59,0	133	24,2	130,6
	TEC3	3,8	4,0	3,4	10,2	7,8	9,4	25,8	14,6	18,0	63,0	19,8	36,4	133,0	24,2	78,6
	TEC4	3,4	2,8	3,8	8,6	6,0	9,4	22,8	9,6	21,0	54,0	11,6	46,8	141,4	14,4	107,4
	TEC5	3,4	3,0	2,2	10,6	4,8	6,6	21,0	7,2	12,2	39,2	9,8	19,6	77,0	12,2	38,4

MM1 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP e 0,7% de Agar; MM2 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP, 0,25mg.L⁻¹ de ANA e 0,7% de Agar; MM3 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP (líquido); TEC1 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA (testemunha); TEC2 – 90 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA; TEC3 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias MS/2; TEC4 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias PBZ 1 mg.L⁻¹; TEC5 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias PBZ 2 mg.L⁻¹.

Oliveira et al. (2011), em estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa sp.*) Caipira (AAA), BRS Caprichosa (AAAB), Preciosa (AAAB), PV 03-76 (AAAB), Thap Maeo (AAB) concluiu que os explantes dos cinco cultivares de bananeira estabelecidos apresentaram respostas variáveis quanto ao número de brotos/rizoma em três subcultivos contínuos. No primeiro subcultivo a cv. Caipira (AAA) e a cv. Thap Maeo (AAB) apresentaram respectivamente, 4,75 e 4,00 brotos por rizoma, no segundo subcultivo, 11,50 e 5,25 brotos por rizoma e no terceiro 41,50 e 11 brotos por rizoma. Mesmo em comparação aos outros grupos genômicos estudados a cv. Caipira (AAA) foi a que teve a maior capacidade de multiplicação de brotos.

Quando analisamos em termos de taxa de multiplicação, obtivemos para cultivar Grande Naine taxas que variaram entre 1,6 a 4,3 brotos/ explante nos tratamentos e subcultivos, gerando uma média geral de 2,6 brotos/ explante, enquanto que para cultivar Prata Catarina os valores foram de 1,2 a 5,3 brotos/ explante, gerando uma média geral de 2,3 brotos/ explante (Tabela 10).

Tabela 10 - Número médio de brotos/ explante ao longo de cinco subcultivos, em mudas de bananeira dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina, submetidas a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação.

Tratamento		1º Subcultivo			2º Subcultivo			3º Subcultivo			4º Subcultivo			5º Subcultivo		
		MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Grande Naine	TEC1	2,0	2,2	2,0	2,5	2,6	2,0	1,7	2,5	2,0	2,8	2,0	2,2	3,0	2,0	2,1
	TEC2	3,6	4,2	3,4	3,5	2,8	3,5	3,5	2,2	3,0	3,1	2,1	1,8	3,2	2,6	3,0
	TEC3	2,6	3,6	3,2	4,2	2,4	2,8	2,8	2,2	2,7	2,8	2,4	1,7	3,5	2,5	2,6
	TEC4	3,0	3,2	4,0	2,3	2,6	2,7	2,9	1,9	2,4	2,6	1,7	1,7	3,4	1,8	2,6
	TEC5	3,4	3,8	3,2	3,4	2,1	4,3	2,9	2,8	2,4	2,8	1,8	1,6	3,3	1,9	2,2
Prata Catarina	TEC1	2,0	2,0	2,0	5,3	2,8	3,4	2,6	1,8	2,7	2,6	1,7	1,8	2,1	1,3	2,1
	TEC2	4,4	3,6	4,4	3,0	2,2	2,9	2,2	1,7	2,2	2,1	1,5	2,0	2,5	1,2	2,4
	TEC3	3,8	4,0	3,4	2,7	2,0	2,8	2,5	2,0	1,9	2,5	1,4	2,2	2,3	1,3	2,3
	TEC4	3,4	2,8	3,8	2,5	3,0	2,5	2,7	1,6	2,3	2,2	1,2	2,4	2,7	1,3	2,4
	TEC5	3,4	3,0	2,2	3,1	1,9	3,0	2,0	1,6	1,9	2,1	1,4	1,8	2,4	1,4	2,2

MM1 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP e 0,7% de Agar; MM2 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP, 0,25mg.L⁻¹ de ANA e 0,7% de Agar; MM3 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP (líquido); TEC1 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA (testemunha); TEC2 – 90 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA; TEC3 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias MS/2; TEC4 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias PBZ 1 mg.L⁻¹; TEC5 – 60 dias em MS com 1mg.L⁻¹ de BAP, 1mg.L⁻¹ de ANA + 30 dias PBZ 2 mg.L⁻¹.

Estas taxas de multiplicação obtidas ao longo dos 5 subcultivos ficam muito próximas as taxas médias de multiplicação obtidas por Carvalho et al. (2012), nos trabalhos desenvolvidos na Embrapa Agroindústria Tropical, onde têm-se efetuado seis subcultivos sucessivos, sendo a concentração de BAP adicionada ao meio de cultura de 2,5 mgL⁻¹. A taxa média de multiplicação registrada tem variado um

pouco em função do cultivar. Para cv. Williams, variedade do grupo Cavendish, esse valor é de 3,5, enquanto, para as do grupo Prata, como Prata Catarina, Prata Anã e Maçã, os índices são 3,0; 2,6 e 2,9 respectivamente. E, para a variedade Tropical (genoma AAAB), têm sido verificadas as taxas de multiplicação de 3,3. O número médio de mudas micropropagadas obtidas, ao final da etapa de alongamento e enraizamento, por ápice caulinar estabelecido *in vitro*, é de 170 para os cultivares que vêm sendo produzidas no laboratório no laboratório da Embrapa (Williams, Prata Catarina e Tropical,), utilizando-se seis subcultivos.

5.2.1.4 Comportamento de número de brotos nos cinco subcultivos, para os cultivares Grande Naine (AAA) e Prata Catarina (AAB)

Os resultados apresentados, através de gráficos, representam a tendência comportamental, referentes ao número médio de brotos por explante inicial estabelecido ao longo dos cinco subcultivos, para o cultivar Grande Naine e para o cultivar Prata Catarina (Figura 16). No primeiro, segundo e terceiro subcultivo observa-se comportamento praticamente linear, modificando para quadrático a partir do quarto e quinto subcultivo. Estes resultados demonstram que a fase de multiplicação, tem comportamento gráfico exponencial crescente.

Trabalhando com modelos matemáticos que apresentam curvas com comportamento exponencial crescente aumentos discretos nas fases iniciais resultam em aumentos significativos nas fases finais. Como este é o comportamento obtido, pode-se sugerir que um aumento discreto do número de brotos no primeiro ou segundo subcultivo, pode resultar em aumento significativo nos subcultivos seguintes, gerando maior número de brotos por explante inicial estabelecido,

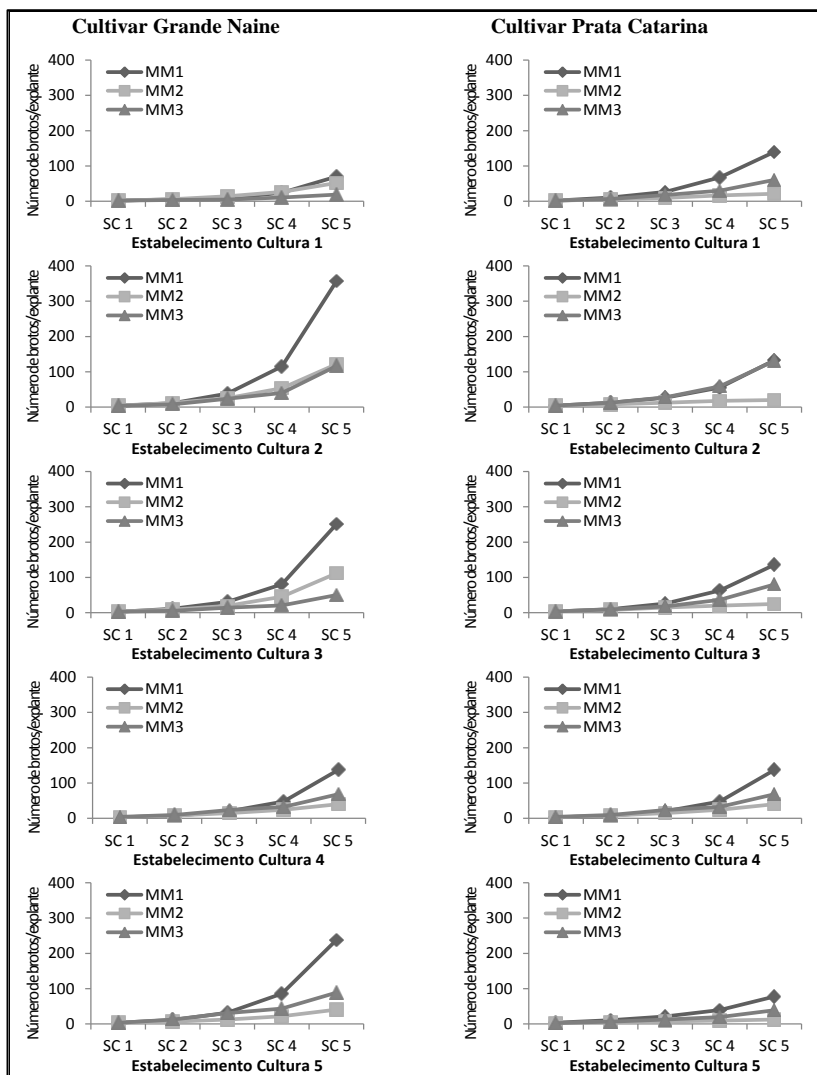


Figura 16 – Tendência comportamental do número médio de brotos por explante ao longo de 5 subcultivos (SC), em mudas dos cultivares Grande Naine e Prata Catarina submetidos a diferentes tratamentos de estabelecimento de cultura e de multiplicação. MM1 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP e 0,7% de Agar; MM2 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP, 0,25mg.L⁻¹ de ANA e 0,7% de Agar; MM3 - MS com 2,5mg.L⁻¹ de BAP (líquido); TEC1: 60 dias (testemunha); TEC2: 90 dias; TEC3: 60 + 30 dias MS/2; TEC4: 60 + 30 dias PBZ 1 mg.L⁻¹; TEC5: 60 + 30 dias PBZ 2 mg.L⁻¹.

Pode-se verificar que o rendimento percentual, obtido por dados de número de brotos introduzidos no início da fase de enraizamento e rendimento no final da fase, demonstram percentuais próximos a 100%, fatos que demonstram pouco efeito endógeno da citocinina, pois houve pouco surgimento de novas brotações e adaptação ao meio de cultura com poucas perdas de material vegetal.

Braga (2001) relatou que a não-utilização de regulador de crescimento e a redução dos nutrientes pela metade foram eficientes para aumentar o vigor vegetativo das culturas, uma vez que os brotos obtidos durante a fase de enraizamento apresentaram quase o dobro do tamanho dos brotos das fases de multiplicação. Isto já era esperado, pois, uma vez enraizados, os brotos têm maior capacidade de absorção dos nutrientes.

Tabela 12 – Rendimento percentual médio de número de brotos por tratamento de multiplicação (TM) da cv. Grande Naine, no final da fase de enraizamento (45 dias).

Tratamentos	Média percentual de nº de brotos
TM1: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP	104,72 A
TM2: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP, 0,25mg.L ⁻¹ de ANA	105,55 A
TM3: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP (semissólido/ líquido, intercalados)	96,02 A
Média Geral	102,09
DMS (Tukey)	13,50
CV (%)	7,82

As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 60 dias de aclimatização as mudas apresentavam bom desenvolvimento em viveiro de telado de sombrite (figura 18).

A aclimatização é necessária porque as mudas produzidas *in vitro* apresentam tamanho reduzido, necessitando de uma etapa intermediária entre a produção da muda em laboratório e o plantio no campo. Na fase de aclimatização para a cv. Grande Naine, obteve-se índice de pega de 100% do material aclimatizado (Tabela 13), gerando um total de 8.995 mudas. Apesar de a aclimatização ter sido efetuada em um período sazonal desfavorável, em função do período de outono, inverno e primavera (maio a novembro), os cuidados no trato, tais como: substrato, umidificação do ambiente, irrigação, limpeza, entre outros, foram imprescindíveis para obtenção do sucesso nesta fase.



Figura 18 - Mudas de *Musa sp.* cv. Grande Naine aos 60 dias da fase de aclimatização em tubetes contendo substrato composto a base de casca de arroz carbonizada, substrato orgânico e calcário. .

De acordo com Kovaleski et al. (2006), a casca de arroz carbonizada tem sido mais utilizada como substrato pois é estável física e quimicamente e mais resistente à decomposição.

Lima & Moraes (2006), em experimento com *Musa sp.* cv. Grande Naine, relataram que na aclimação, as perdas de plântulas foram muito baixas (2,2%). Entretanto, alguns ajustes no sistema de irrigação e luminosidade na casa de vegetação foram realizados para reduzir tais perdas.

Tabela 13 - Número total de brotos nas fases de enraizamento e aclimação e percentuais de rendimento em tratamentos para *Musa sp* cv. Prata Catarina.

	TEC1			TEC2			TEC3			TEC4			TEC5		
	TM1	TM2	TM3	TM1	TM2	TM3	TM1	TM2	TM3	TM1	TM2	TM3	TM1	TM2	TM3
Início enraizamento	700	107	304	665	100	656	678	123	400	703	71	538	387	61	193
Final enraizamento	638	102	283	545	93	387	420	95	192	415	60	307	233	33	108
Rendimento (%)	91,14	95,33	93,09	81,95	93	58,99	61,95	77,24	48	59,03	84,51	57,06	60,21	54,1	55,96
Início Acl. (< 2 cm)	201	14	91	217	33	227	210	35	109	247	43	173	114	15	69
Início Acl. (> 2 cm)	437	88	192	328	60	160	210	60	83	168	17	134	119	18	39
Total Aclimatizado	638	102	283	545	93	387	420	95	192	415	60	307	233	33	108
Final Aclimação	638	102	283	545	93	387	420	95	192	415	60	307	233	33	108
Rendimento (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TEC – Tratamento de Estabelecimento de Cultura; TM – Tratamento de Multiplicação; Acl. – Aclimação.

A cv. Prata Catarina resultou em rendimentos inferiores a Grande Naine na fase de enraizamento. Um dos fatores foi que algumas

brotações, principalmente as menores, inoculadas do quinto subcultivo de multiplicação, para a fase de enraizamento, após 45 dias de cultivo não apresentaram crescimento e enraizamento, impossibilitando a aclimatização. Através da Tabela 13 pode-se observar que os tratamentos que obtiveram os menores rendimentos iniciaram a fase de aclimatização com as maiores quantidades de brotações com tamanho inferior a 2 cm. Efetuando análise de variância (ANOVA), em anexo 30, não foi observada significância estatística entre o material vegetal proveniente dos diferentes meios de multiplicação (Tabela 14).

Tabela 14 – Rendimento percentual médio de número de brotos por tratamento de multiplicação (TM) da cv. Prata Catarina, no final da fase de enraizamento (45 dias).

Tratamentos	Média percentual de n° de brotos
TM1: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP	70,84 A
TM2: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP, 0,25mg.L ⁻¹ de ANA	80,84 A
TM3: MS com 2,5mg.L ⁻¹ de BAP (semissólido/ líquido, intercalados)	62,62 A
Média Geral	71,43
DMS (Tukey)	27,50
CV (%)	22,84

As médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo geral, as plântulas enraizadas em meio semissólido apresentaram maior crescimento radicular, em relação às plântulas enraizadas em meio líquido contendo 40 mL de meio MS com metade da concentração dos macronutrientes, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e sem a adição de hormônios (CAMOLESI, 2010).

Na fase de aclimatização para a cv. Prata Catarina, o índice de pega foi de 100% para todos os tratamentos, gerando um total de 3.911 mudas, fatores tais como os citados para a cv. Grande Naine, que obteve praticamente os mesmos percentuais, também são aqui atribuídos para obtenção do sucesso nesta fase.

Embora a fase de aclimatização seja considerada uma etapa delicada para várias culturas, as taxas de sobrevivência observadas em diferentes estudos demonstram que mudas micropropagadas de bananeira apresentam excelente capacidade de adaptação ao sistema ex vitro (NOMURA et al., 2012).

6.0 CONCLUSÕES

Os cultivares em estudo, de grupo genômico diferentes, *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine e *Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (AAB) cv. Prata Catarina, apresentaram respostas diferentes aos tratamentos propostos, tanto na fase de estabelecimento de cultura, quanto na fase de multiplicação.

Na fase de estabelecimento de cultura, o tratamento TEC2 com 90 dias, do cultivar Grande Naine, não apresentou os maiores desenvolvimentos de volume e altura, teor de carboidratos totais, teor de amido e nem os menores percentuais de oxidação, porém apresentou as maiores taxas de multiplicação. Sendo que TEC2 teve como variável apenas o tempo de cultivo estes dados mostram, para este genótipo, que o aumento do tempo de cultivo na fase de estabelecimento de cultura está diretamente ligado ao aumento da taxa de multiplicação.

O uso de paclobutrazol na fase de estabelecimento de cultura para cultivar Grande Naine, promove o aumento do volume do explante, o que resulta em aumento da taxa de multiplicação.

Os tratamentos propostos na fase de estabelecimento de cultura, do cultivar Prata Catarina, não apresentam efeitos significativos, em termos de incremento na taxa de multiplicação. Sem diferencial, em comparação ao tipo de tratamento que vem sendo utilizado em biofábricas, não gerou uma nova proposta de protocolo de micropropagação.

Na fase de multiplicação, em ambos os cultivares em estudo, o meio de multiplicação MM1 (MS, adicionado de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, semissólido), foi o mais eficiente em relação a taxa de multiplicação.

Os tratamentos de multiplicação utilizado meio semissólido alternando com meio líquido nos subcultivos, resulta em taxas de multiplicação menores que tratamentos com a utilização de apenas meio semissólido.

Assim, uma proposta geral de protocolo para o cultivar Grande Naine teria a seguinte configuração:

- Estabelecimento de cultura: Meio MS acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA, mantido por 90 dias.
- Multiplicação: MS acrescido de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP em 5 subcultivos de 30 dias.

- Enraizamento e crescimento: MS com 50% dos sais da formulação, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,7% de ágar, em cultivo por 45 dias.

O enraizamento utilizando o meio MS com 50% dos sais da formulação, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,7% de ágar em cultivo por 45 dias, foi eficiente para cv. Grande Naine e necessita de ajustes para cv. Prata Catarina.

O método de aclimatização utilizado é eficiente para ambos os cultivares em estudo.

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados importantes foram obtidos com a realização do trabalho, pois apesar de a multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, e apresentar protocolos de micropropagação definidos, o trabalho mostrou que ajustes nos protocolos podem gerar um incremento significativo, no número de mudas produzidas. Porém, apesar de existirem biofábricas com ótimos controles de processos, que trabalham com percentuais de 2% de variação somaclonal em seus lotes de mudas produzidos, sabe-se que qualquer alteração nos protocolos de micropropagação pode resultar no aumento desta variação.

As mudas produzidas neste trabalho foram encaminhadas a produtores da região de Santa Catarina, para plantios em forma experimental, para que após crescimento seja identificada e quantificada variações somaclonais a campo.

Outro fato importante diz respeito a diferença de respostas obtidas para os grupos genômicos testados, onde (AAA) obteve maiores incrementos de número de mudas obtidas que o grupo genômico (AAB), mostrando que mais estudos devem ser realizados para obtenção e otimização de novos protocolos de micropropagação em diferentes genótipos, grupos genômico e até em diferentes variedades dentro do mesmo grupo genômico.

Futuros experimentos em que constem análises hormonais e análises histológicas que mostrem o tipo de tecido vegetal que está sendo regenerado na fase de estabelecimento de cultura, de forma qualitativa e quantitativa, poderiam melhor elucidar o comportamento fisiológico nesta fase e ao longo das outras fases de micropropagação.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, p. 177-188, 2012.

ÁLVAREZ, M. do C.; CALDAS, L.S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.3, p. 415-420, mar. 2002.

ALVES, E. J., et al. Propagação. *In*: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Org.). **A cultura da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.

ALVES, E.J. **Cultivo de bananeira tipo terra**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2001. 176p.

ALVES, E. J. **A Cultura da Banana no Brasil e proposições para o seu Melhoramento**. Cruz das Almas, BA, EMBRAPA/ CNPMF, 1991, 40p. (CNPMPF. Documentos 32).

AWAD, M.; CASTRO, P.R.C. **Introdução à fisiologia vegetal**. São Paulo: Nobel, 1983. 177p.

BADENHUIZEN, N.P. Occurence and development of starch in plants. *In*: WHISTLER, R.L.; PASCHALL, E.P. **Starch chemistry and tecnology: Fundamental aspects**. Academic Press, New York, p. 65-70, 1965.

BAIRÚ, M. W.; FENNELL, C. W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. ‘Zelig’). **Rev. Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.

BASSAN, J. S., et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubirum* (SPRENG/TAUB). **Ciência Florestal**: Santa Maria, v.16, n.4, p.381-390, 2006.

BISSING, D.R. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. **Stain Technology**, v. 49, 1974, p. 116-117.

BORGES, A. L., et al. A cultura da banana/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3ed. **Rev. e amp**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, (Coleção Plantar, 56), 2006.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. 1ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, 279 p.

BRAGA, M. F.; SA, M. E. L. DE; MUSTAFA, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2001, vol.23, n.2, pp. 215-219. ISSN 0100-2945.

BUCHANAN, B.; GROISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Biology of Plants. In: Coruzzi, G. & Last, R. eds. **Amino Acids**. American Society of Plant Physiologists, p.358-410, 2000.

CAMOLESI, M. R. et al. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira “Maça”. **Rev. Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, p. 1237-1241, ago. 2007.

CAMOLESI, M. R. et al. **Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira "Maça"**. Ciência Rural, Santa Maria - RS, v. 40, n. 2, p.255-260, fev. 2010.

CARVALHO, A. C. P. P. de; JESUS, A. A. de; SANTOS, E. de O. **Produção de Mudas Micropropagadas de Bananeira**. Fortaleza CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012, 14 p. (Circular Técnica 37).

CASTRO, P. R. C. **Reguladores vegetais: perspectivas de aplicação em cana-de-açúcar**. Stab, Piracicaba, v.,1, n.3, p. 26-28, 1983.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Ceres, 2008. 864 p.

CASTRO, A. C. R., et al. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.385, 2009.

CAVATTE, R. P. Q. **Produção e qualidade dos frutos das Bananeiras Prata Anã e Fhia 01, tratadas com Paclobutrazol**. Viçosa MG. 46 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 2ed. Enfield: Science Publishers, 2004. 538 p.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* da bananeira cultivar Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, v. 28 p.280 – 283. Ago. 2006.

CÔTE, F. X., et al. **Variations in micropropagated bananas and plantains**. Literature Survey. Fruits, v. 48, p.15-22, 1993.

DANTAS, J. L. L.; PEREIRA, G. A. G. Propagação da bananeira in vivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.1, n.10, p. 53-63, 1988.

DANIELLS, J., et al. Diversity in the Genus Musa. In: ARNAUD, E.; SHARROCK, S. (Ed.). **Musalogue**: a catalogue of Musa germplasm. Montpellier: INIBAP, 213 p., 2001.

DEBIASI, C.; ZAFFARI, G. R.; GUERRA, M. P. **Efeitos de antiauxinas e outros fitorreguladores na formação de brotos laterais de bananeira “in vitro”**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16, 2000, Fortaleza, CE. Fortaleza: SBF, 2000. 1 CD-ROM.

DEBIASI, C. **Caracterização fisiológica e bioquímica da dominância apical em bananeira (*Musa acuminata* Colla)**. Butucatú – SP. 2007. 154 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas.

DEBIASI, C. Anais. In: Simposio Brasileiro sobre Bananicultura, 7., 2010, Registro - Sp. **Elitização da Bananicultura com utilização da Micropropagação**. Registro: Sibanana 2010, 2010. p. 1 - 6. CD-ROM.

DUBOIS, M., K. A. et al., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 1956, v. 28, p. 350–356

DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAYL, M.& FRANCLLET, A. Vegetative propagation of Eucalyptus. In: **Tissue Culture in Forestry**. Bonga & Durazan, eds. MartinusNijhoff. The Hague. p. 15-151, 1982.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extenssão Rural de Santa Catarina. **Banana Recomendações técnicas para o cultivo em Santa Catarina 2013**. Disponível em: <http://carcara.epagri.sc.gov.br/epagri/?page_id=1349>. Acesso em: 21 Set de 2013.

EPAGRI/ CEPA. **Síntese Annual da Agricultura de Santa Catrina 2011-2012**. Florianópolis - SC: Epagri/ Cepa, 2012 – Anual. v.1, p. 21-29. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 18 de Outubro de 2013.

FAO. **Food and Agricultural Organization**. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/portal/ag-home/en/>>. Acesso em: 10 Set de 2013.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.

FLORES, P. S. **Propagação in vitro e in vivo de *Hippeastrum aulicum* (Ker- Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GANEM, S. T. S. **Bactérias endofíticas em explantes de bananeira tropical e galil 18**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2008.

GANGA, R. M. D. Resultados parciais sobre o comportamento de seis cultivares de banana (*Musa* spp) em Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais**. Belém Embrapa/DDT, 2002. 1CD- ROM.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1 ed. São Paulo: Atiqua, 2011. cap. 1, p. 14-31.

GIBSON, S.I. Plant sugar-response pathways: Part of a complex regulatory web. **Rev. Plant Physiology**, v.124, p.1532-1539, 2000.

GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; KHANUJA, S. P. S. Cost-effective Approaches for *in vitro* mass Propagation of *Rauwolfia serpentine* Benth. Ex Kurz. **Asian Journal of Plant Science**. Índia, V. 6. p. 957 – 961, 2007

GOWEN, S. **Banana and Plantains**. Chapman & Hall, Natural Resources Institute, Chatham, UK, 612p., 1995.

HINZ, R. H.; LICHTENBERG, L. **Banana: Produção, Pós-colheita e Mercado**. Fortaleza: Instituto Frutal, p.62-89, 2004.

HIRIMBUREGAMA, K.; GAMAGE, N. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa spp.* (banana end plantain). **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 72, n. 2, p. 205 – 211. 1997

HORVATH, D.P., et al. Knowing when to grow: signals regulation bud dormency. **Rev. Trends Plant Sci.**, v. 8, n. 11, p. 534-540, 2003.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **LSPA - Levantamento Sistemático de Produção Agrícola**.

Disponível

em:<www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa/lspa_201205.pdf>. Acesso em 02/01/2015.

IKRAM-UL-HAQ; DAHOT, M. U. Micro-propagation efficiency in banana (*Musa* sp.) under different immersion systems. **Pakistan Journal of Biology Sciences**, v.10, n.5, p. 726-733, 2007.

JANG, J.; LEÓN, P.; ZHOU, L.; SHEEN, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. **Plant Cell**, v. 9, p. 5-19.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KHAN, S.; SAEED, B.; KAUSER, N. **Establishment of genetic fidelity of in-vitro raised banana plantlets**. Pakistan Journal of Botany, v. 43, n. 1, p. 233-242, 2011.

KOCH, K.E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 235-246. 2004.

KOVALESKI, A. et al., **Produção de morangos no sistema semi-hidropônico**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006

KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R. Aspectos histoquímicos da formação de protocormóides em ápices radiculares de *Catasetum pileatum* cultivados *in vitro*. In: F. Barros, & G.B. Kerbauy (eds.). **Orquidologia Sul Americana: uma compilação científica**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 85-89, 2004.

LEE, S. W. **Micropropagation of Cavendish banana in Taiwan**. 2006. Disponível em: <http://www.agnet.org/library.php?func=view&id=20110809105140>. Acesso em: 12 out. 2013.

LÉON, P.; SHEEN, J. Sugar and Hormones connections. **Rev. Trends in Plant science** 8, p.110-115, 2003.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: BARRUETO, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 103-127.

LEMOS, E. E. P., et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p. 482-487, 2001.

- LESSA, L. S. **Avaliação agronômica, seleção simultânea de caracteres múltiplos em híbridos diplóides (AA) e desempenho fisiológico de cultivares de bananeira**. Cruz das Almas, BA, 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007
- LI, LIN-FENG. Origins and domestication of cultivated banana inferred from chloroplast and nuclear genes. **Rev. Plos one**, v. 8, n.11, 2013.
- LICHTENBERG, L. A.: LICHTENBERG, P. DOS S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. especial, p.29-36, 2011.
- LICHTENBERG, L. A., et al. Banana. In: EPAGRI (Ed.) **Avaliação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 2002/2003**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.31-37.
- LIMA, J. D.; MORAES, W. da S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. São Paulo, 2006. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, p. 13-19, 2006.
- MANICA, I. **Fruticultura tropical 4, banana**. Porto Alegre. p.485, 1997.
- McCREADY, R. M., et al. **Determination of starch and amylose in vegetables**. Application to peas, p. 1156-1158, 1950.
- MENDES, B.M.J.; MENDES, F.J.; TULMANN NETO, A.; DEMÉTRIO, C.G.B. e PUSKE, O.R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.12, p.863-867, 1996.
- MORAES, W. da S.; PEREIRA, T. G.; CARNEIRO, O. L. G. A situação atual da sigatoka-negra no sudeste brasileiro. In: Simpósio brasileiro Sobre Bananicultura, 7., 2010, **Registro**. Anais Registro: SBF/APTA-SP/ABAVAR, p.43-58, 2010.
- MOREIRA, R. S., **Banana: teoria e prática de cultivo**. São Paulo, Fundação Cargil, 2. ed. 1999. CDROM

MOREIRA, R. S.; CORDEIRO, Z. J. M. A história da banana no Brasil. In: Reunião Internacional da ACROBAT, 17., 2006. Joinville. **Anais**. Joinville: ACROBAT/ ACAFRUTA, v.1, p. 48-82, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobaccotissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p. 473-497, 1962.

NAKAYAMA, L. H. I. **Alternativas para Propagação das Mudas Sadias de Bananeiras (*Musa spp*)**. 6. ed. Belém Pa: Ceplac, 2012. Disponível em: <www.ceplacpa.gov.br>. Acesso em: 1 nov. 2013.

NOMURA, E. S.; DAMATTO JÚNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira ‘Grand Naine’ com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, v.59, n.4, p.518-529, 2012. .

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368, 1965.

OLIVEIRA, H. S., et al., **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa spp*)**. Acta Amazônica. vol. 41 2011. p. 369 – 376.

OLIVEIRA, H. S. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. Belém, 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S.O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.415-420, 1997.

PEREIRA, G. A., et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘IAC 2001’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.43-46, 2009.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. especial, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, G. A.; BOLIANI, A. C. Anais. In: Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (bananas e plátanos), 10.ed, Fortaleza, 2013. **Concentrações de 6-benzilaminopurina e Cinetina na Avaliação do Protocolo de Micropropagação de Bananeira ‘Thap Maeo’**. Fortaleza - CE: Acrobat, 2013. p. 234. CD-ROM.

PEREIRA, L. V.; SILVA, C. R. R.; ALVARENGA, A. A. Influência do tipo de muda no comportamento vegetativo e produtivo da bananeira cv. Prata Anã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 164-167, 2001.

PERES, L.E.P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Pesquisa: Um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, mar/abr. 2002.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and PlantMolecular Biology**, Palo Alto, California, v.51, p.501-531, 2000

RAMOS, D. P., et al. Avaliação de genótipos de bananeira em Botucatu - SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1092-1101, 2009.

RESMI, L.; NAIR, A. S. **Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid *Musa* cultivars**. International Journal of Integrative Biology, v. 11, n.1, p. 35-38, 2011.

REUVENI, O.; ISRAELI, Y.; LAHAV, E. Somaclonal variation in bananas. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, somaclonal variation in crop improvement II**. Amsterdam: Elsevier Science, 1996. p. 174-196.

RIBEIRO, M. C. C. et al. Utilização do Retardante de crescimento Paclobutrazol em Girassol (*Helianthus annuus*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1104 – 1106, jul 2007.

RIOS, S. A., et al. Protocolos de assepsia e comprimento de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ sobre a produção de mudas por micropropagação. **Unimontes Científica**, Montes Claros, V. 10. N. ½, 2008

RODRIGUES, J. D; GODOY, L. J. G.; ONU, ELISABETH O. **Reguladores vegetais: Bases e princípios para utilização em gramados**. II SIGRA – Simposio sobre Gramados, UNESP, SP, 2004.

ROELS, S., et al. **Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by tempory immersion system**. Plant Cell, Tissue and Organ cultura, Dordrecht, v.82, p.57-66, 2005.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. Oxford University Press. New York. 1999.

SA, MARIA EUGÊNIA LISEI DE; BRAGA, MARCELO FIDELES. **Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata-Anã (subgrupo AAB)**. Revista Brasileira de Fruticultura. 2002, vol.24, n.1, pp. 236-239.

SACHS, T. **Pattern formation in plant tissue**. Cambridge University Press, New York, 1991.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.R.; BOLLAMMA, K.T. **Invited review: analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*)**. *In vitro* Cellular & Developmental Biology, p. 551–556, 2003.

SALISBURY, F.B & ROSS, C.W. **Plant Phisiology**. Belmont, Wadsworth, 1992. 682 p.

SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. **Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar ‘Pacovan’**. Bragantia-Campinas-SP, v.63, n.2, p.201-205, 2004.

SANDOVAL-YUGAR, E. W. et al., **Encapsulamento de microbrotos e conversão em plantas de *Musa sp.* cultivar 'Grand Naine'**. *Cienc. Rural* [online]. 2009, vol.39, n.4, pp. 998-1004. Epub Feb 20, 2009. ISSN 0103-8478.

SANTOS-SEREJO, J. A., et al. Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 237-255.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; COSTA, F.H.S.; OLIVEIRA, J.P. Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: GONÇALVES, R.C.; OLIVEIRA, L.C. de (Ed.). **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2009. p.247-284.

SHANNON, J. C. **A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels**. Research Bulletin (Purdue). v.1, n.8, p. 842, 1968.

SINGH, H. P.; SELVARAJAN, S. U.; KARIHALOO, J. L. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific**. Nova Delli, Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB)/APAARI, p.94, 2011.

SILVA, C. K. et al., Multiplicação *in vitro* de seguimentos apicais caulinares de *Setureja hortensis* L. (Lamiaceae). Santa Maria. RS, p. 23 - 31 Anais I Simpósio de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas. 2011.

SILVA, S. O., et al. Bananeira. In: BRUCKNER, C. H. (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa. UFV, 2002. p.101-157.

SILVA O. S., SANTOS-SEREJO J. A., CORDEIRO, Z. J. M. In: BORGES A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. Variedades. 21. ed. Cruz das Almas: Embrapa, 2004. p. 45-58.

SILVA, E. A.; BOLIANI, A. C.; CORRÊA, L. S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria-MT. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.101-103, 2006.

SILVA, K. S.; FARIA JR, M. J. de A. Uso de paclobutrazol como estratégia para redução do porte e da brotação lateral de plantas de tomateiro. **Ciênc. Agrotec., Lavras**, v. 35, n. 3, p. 539-543, 2011.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.**, v. 51, p. 49-81, 2000.

SMITH, A.M., ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M. Starch degradation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.56, p. 73-97, 2005.

SOLURI, J. Consumo de massas, biodiversidade e fitomelhoramento da banana de exportação 1920-1980. **Rev. Varia Historia**, Belo Horizonte, v. 24, n. 39, p. 47-70, 2008.

SOUZA, B. M. **Retomada do ciclo celular induzida por variações dos teores endógenos de hormônios, açúcares e aminoácidos em primórdio de gema axilar de *Ananas comosus* L. (Merr.)**, São Paulo, 2006. 181 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, 2006.

SOUZA, A.S. et al. Propagação. *In*: ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p.151-195.

SOUZA, A.S.; CORDEIRO, Z.J.M.; TRINDADE, A.V. Produção de mudas, p.39-46. *In*: Cordeiro, Z.J.M. **Banana: produção**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

SOUZA, A. P. R de. **Antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento in vitro de *Schomburgkia crispa* Lindl**. Enciclopédia biosfera: Goiania, v. 10, n 18, p. 334, 2014.

SOUZA, D. S. et all., Micropropagação das bananeiras Prata Anã e Fhia 01, a partir de explantes de plantas tratadas com Paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. São Paulo, v. 32, n. 2, p. 561 – 570, 2010.

SOUZA, S. A. et al. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.11-151, 2006.

SOTO BALLESTERO, M. **Cultivo y comercialización Del banano**. 2. ed. Tibás: LIL, 1992. 649 p.

STALS, H.; INZÉ, D. When plant cell decide to divide?. **Trends in Plant Sci.**, v. 6, n. 8, p. 359-364, 2001.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2ed. New York, Mc Graw Hill, 1980. 633p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TRINDADE, A. V.; LINS, G. M. L.; MAIA, I. C. S. Substrates and the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* in the growth of micropropagated bananas plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n. 1, p. 137-142, 2003.

TOMILIN, C. **The pesticide manual handboock**. 10ed. Inglaterra: British Crop Protectio Council,1995. 1341 p.

TULMANN NETO, A. et al. Metodologia *in vivo* visando a indução de mutações no melhoramento de bananeira Maçã. **Rev. Bras. Genét.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p.871-879, 1989.

ULISSES, C., et al. **Clonagem Vegetal**. 2010. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7. Disponível em: <www.scielo.org>. Acesso em: 03/01/2015.

UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. **Method for glucose deterrnination and other sugars**. Manornetric techniques. Burgess Publishing Co, 1964.

USCIATI, M.; CODACCIONI, M.; GUERN, J. Early cytological and biochemical events induced by 6-benzylaminopurine application on axillary buds of *Cicer arietinum* plants. **J. Exp. Bot.**, v. 23, n. 77, 1009-1020. 1972.

VAN'T HOF, J. Experimental control of DNA synthetizing and dividing in excised root tips of Pisum. **Am. J. Bot.**, v. 53, n. 10, p. 970-976. 1966.

VAN'T HOF, J. Control of cell proppression through the mitotic cycle by carbohydrate provision. **Journal of Cell Biology**, v.37, p.773-780, 1968.

VUYLSTEKE, D.; LANGHE, E. **Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains**. Tropical Agriculture, n.62, p.323-328, 1985.

WILKEN, D., et al. **Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa spp.* cv. 'Grande naine' AAA)**. *In vitro* cellular & developmental biology. Wilken, Dirk, v.50, n.5, p.582, 2014.

ZAFFARI, G. R. **Aspectos hormonais, estruturais e genéticos relacionados a micropropagação de gemas adventícias de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grande Naine**. (Tese de doutorado) Botânica – Instituto de Botanica, USP, São Paulo, 1998.

ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra de dominância apical, sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira, *in vitro*. **Rev. Bras. de fruticultura**, v.16, n3, p.71-76, 1994.

9.0 ANEXOS

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume médio de explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 43,30.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	3	1214727	404909	0,1114 Ns
Resíduos	93	337953661	3633910	
Total	96	339168388		

G.L. – grau de liberdade; Ns - não significativo.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume médio de explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 36,10.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	3	774451	258150	0,3473 Ns
Resíduos	128	95134397	743237	
Total	131	95908848		

G.L. – grau de liberdade; Ns - não significativo.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA), referente ao nível de oxidação em explantes *in vitro* da cultivar Grande Naine; CV% = 13,35.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	4533	1133	7 **
Resíduos	70	11333	161	
Total	74	15866		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA), referente ao nível de oxidação em explantes *in vitro* da cultivar Prata Catarina; CV% = 5,81.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	133	33.3	1 Ns
Resíduos	70	2333	33,3	
Total	74	2466		

G.L. – grau de liberdade; Ns - não significativo.

Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA), referente a altura de explantes *in vitro* da cultivar Grande Naine; CV% = 15,6.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	422.34667	105.58667	5.2444**
Resíduos	70	1409.33333	20.13333	
Total	74	1831.68000		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume de explantes *in vitro* da cultivar Grande Naine; CV% = 40,52.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	58.91453	14.72863	3.2502*
Resíduos	67	303.61349	4.53154	
Total	71	362.52802		

G.L. – grau de liberdade; * - significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA), referente a altura de explantes *in vitro* da cultivar Prata Catarina; CV% = 11,84.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	80.58667	20.14667	2.2771Ns
Resíduos	70	619.33333	8.84762	
Total	74	699.92000		

G.L. – grau de liberdade; Ns - não significativo.

Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA), referente ao volume de explantes *in vitro* da cultivar Prata Catarina; CV% = 32,12.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	4	19.67437	4.91859	4.4303**
Resíduos	70	77.71544	1.11022	
Total	74	97.38981		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de amido em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 20,59.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	5	12.13140	2.42628	28.8877**
Resíduos	12	1.00788	0.08399	
Total	17	13.13928		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 15,17.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	5	12.95712	2.59142	21.0734**
Resíduos	12	1.47565	0.12297	
Total	17	14.43277		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de amido em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 12,28.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	5	5.41507	1.08301	51.1889**
Resíduos	12	0.25389	0.02116	
Total	17	5.66895		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 11,17.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	5	63.57817	12.71563	108.1889**
Resíduos	12	1.41025	0.11752	
Total	17	64.98842		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA), referente ao número de brotos/rizoma obtidos no quinto subcultivo da fase de multiplicação da cultivar Grande Naine. Demonstrando interação entre os tratamentos da fase de estabelecimento de cultura TEC e tratamentos de multiplicação TM.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
TEC Estab. Cultura	4	196986.85333	49246.71333	245.4237 **
Resíduos	20	4013.20000	200.66000	
Parcelas	24	201000.05333		
TM Multiplicação	2	324180.18667	162090.09333	685.1097 **
Interação TEC x TM	8	105027.54667	13128.44333	55.4903 **
Resíduos	40	9463.60000	236.59000	
Total	74	639671.38667		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA), referente ao número de brotos/rizoma obtidos no quinto subcultivo da fase de multiplicação da cultivar Prata Catarina. Demonstrando interação entre os tratamentos da fase de estabelecimento de cultura TEC e tratamentos de multiplicação TM.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
TEC Estab. Cultura	4	24007.14667	6001.78667	80.3524 **
Resíduos	20	1493.86667	74.69333	
Parcelas	24	25501.01333		
TM Multiplicação	2	143412.5066	71706.2533	616.8103 **
Interação TEC x TM	8	17914.69333	2239.33667	19.2626 **
Resíduos	40	4650.13333	116.25333	
Total	74	191478.3466		

G.L. – grau de liberdade; ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA), referente ao rendimento obtido na fase de enraizamento em explantes da cultivar Grande Naine; CV% = 7,84.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	2	278.64977	139.32489	2.1731 Ns
Resíduos	12	769.34980	64.11248	
Total	14	1047.99957		

G.L. – grau de liberdade; Ns – não significativo.

Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA), referente ao teor de carboidratos totais em explantes da cultivar Prata Catarina; CV% = 22,84.

Causas de variação	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	P-valor
Tratamento	2	832.21	416.10	1.5630 Ns
Resíduos	12	3194.70	266.22	
Total	14	4026.92		

G.L. – grau de liberdade; Ns – não significativo.